

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-514059  
(P2002-514059A)

(43) 公表日 平成14年5月14日 (2002.5.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/02		29/00	
29/00		35/04	
35/04		C 0 7 K 14/47	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平10-523781	(71) 出願人	シーオーアール セラビューティクス、インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成9年11月18日 (1997. 11. 18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080,
(85) 翻訳文提出日	平成11年5月18日 (1999. 5. 18)		サウス サンフランシスコ, イー, グランド アベニュー 256
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 7 / 2 0 9 5 1	(72) 発明者	リ, シェンフェン
(87) 国際公開番号	W O 9 8 / 2 2 5 8 3		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,
(87) 国際公開日	平成10年5月28日 (1998. 5. 28)		ベルモント, ラデラ ウェイ 1114
(31) 優先権主張番号	0 8 / 7 5 3 , 0 3 8	(72) 発明者	フィリップス, デイビッド アール,
(32) 優先日	平成8年11月18日 (1996. 11. 18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402,
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		サン マテオ, バロット ドライブ 245
(31) 優先権主張番号	0 8 / 9 7 2 , 7 1 9	(74) 代理人	弁理士 山田 行一 (外1名)
(32) 優先日	平成9年11月18日 (1997. 11. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インテグリンに結合し、そしてインテグリン媒介シグナル伝達に関与するタンパク質、B a p-1 の同定

## (57) 【要約】

本発明は、β 3 インテグリン、α I I b および Src キナーゼに結合し、そしてインテグリン媒介シグナル伝達に関与するタンパク質のアミノ酸およびヌクレオチド配列を提供する。この開示に基づき、本発明は、インテグリン媒介シグナル伝達をブロックする薬剤を同定する方法、インテグリン媒介シグナル伝達をブロックし生物学的および病理学的プロセスを調整する薬剤を用いる方法、ならびにインテグリン媒介シグナル伝達をブロックする薬剤を提供する。

## 【特許請求の範囲】

1. 図1に示されるアミノ酸配列、および該アミノ酸配列の対立遺伝子座変異体をコードする、単離された核酸分子。

2. 前記核酸分子が、1つ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結される、請求項1に記載の単離された核酸分子。

3. 前記核酸分子がバクター中に含まれる、請求項1に記載の単離された核酸分子。

4. Bap-1ファミリーのタンパク質のメンバーをコードする単離された核酸分子であって、明瞭なシグナルを生成するに十分なストリンジェンシー条件下で、請求項1に記載の核酸分子にハイブリダイズする、核酸分子。

5. Bapファミリーのタンパク質のメンバーをコードする単離された核酸分子であって、明瞭なシグナルを生成するに十分なストリンジェンシー条件下で、請求項1に記載の核酸分子にハイブリダイズする、核酸分子。

6. 形質転換されて請求項1に記載の核酸分子を含む、宿主。

7. 原核生物宿主および真核生物宿主からなる群から選択される、請求項6に記載の宿主。

8. Bap-1タンパク質を生成する方法であって、請求項2に記載の核酸分子で形質転換された宿主を、Bap-1タンパク質が発現される条件下で培養する工程を包含する、方法。

9. 前記宿主が、原核生物宿主および真核生物宿主からなる群から選択される、

請求項8に記載の方法。

10. 図1に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質。

11. 請求項10に記載のタンパク質に結合する、単離された抗体。

12. モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項11に記載の抗体。

13.  $\alpha$  IIb、Srcキナーゼ、および $\beta$ 3インテグリンからなる群から選択されるタンパク質の、Bapシグナル伝達複合体との相互作用をブロックする方法であ

って、該タンパク質を、Bapタンパク質またはBapシグナル伝達複合体の該タンパク質への結合をブロックする薬剤と接触させる工程を包含する、方法。

14. 前記薬剤が、 $\beta$ 3インテグリンの細胞質ドメインに選択的に結合することによって、前記タンパク質の前記Bapまたは前記Bapシグナル伝達複合体への結合をブロックする、請求項13に記載の方法。

15. 前記薬剤が、Bapタンパク質のフラグメントである、請求項14に記載の方法。

16. 前記薬剤が、Bapタンパク質に選択的に結合することによって、前記タンパク質の前記Bapまたは前記Bapシグナル伝達複合体への結合をブロックする、請求項13に記載の方法。

17. 前記薬剤が、Bapタンパク質を結合する抗体である、請求項16に記載の方法。

18. 前記ブロックすることが、インテグリン発現細胞の細胞凝集を低減する、

請求項13に記載の方法。

19. 前記ブロックすることが、インテグリン発現細胞の細胞付着を低減する、請求項13に記載の方法。

20. 前記ブロックすることが、インテグリン発現細胞の細胞移動を低減する、請求項13に記載の方法。

21. インテグリンシグナル伝達によって媒介される病理学的状態の重篤度を低減する方法であって、 $\beta$ 3インテグリンを、Bapタンパク質またはBapシグナル伝達複合体の該インテグリンへの結合をブロックする薬剤と接触させる工程を包含する、方法。

22. 上記病理学的状態が、血栓症、炎症および腫瘍転移からなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

23.  $\alpha$ IIb、Srcキナーゼおよび $\beta$ 3インテグリンからなる群から選択されるタンパク質の、Bapタンパク質またはBapシグナル伝達複合体との相互作用をブロックする薬剤を同定する方法であって：

a)  $\beta$  3 インテグリン、該インテグリンの  $\beta$  3 サブユニット、Src キナーゼ、または  $\alpha$  IIb を、Bap タンパク質または Bap シグナル伝達複合体および試験されるべき薬剤とともにインキュベートする工程、ならびに

b) 該薬剤が、該 Bap タンパク質または Bap 複合体の、該  $\beta$  3 インテグリン、該  $\beta$  3 サブユニット、該 Src キナーゼ、または該  $\alpha$  IIb への結合をブロックするかどうかを決定する工程、  
を包含する、方法。

24. 前記 Bap タンパク質または前記 Bap シグナル伝達複合体が、細胞の抽出物中に含まれる、請求項 23 に記載の方法。

25. インテグリン媒介シグナル伝達をアッセイする方法であって、Bap タンパク質が発現されるか否かを決定する工程を包含する、方法。

26. a) 細胞の抽出物を調製する工程、および

b) 該細胞抽出物のタンパク質を調べ、Bap タンパク質の存在を決定する工程；  
をさらに包含する、請求項 25 に記載の方法。

27. a) 細胞の抽出物を調製する工程、および

b) 該細胞抽出物の mRNA を調べ、Bap をコードする mRNA の存在を決定する工程；  
をさらに包含する、請求項 25 に記載の方法。

28. インテグリンシグナル伝達複合体を同定する方法であって：

a) インテグリンを発現する細胞から抽出物を調製する工程、

b) 該抽出物を、Bap タンパク質または Bap/ $\beta$  3 インテグリン複合体とともにインキュベートする工程、および

c) 該シグナル伝達複合体を結合した Bap または Bap/ $\beta$  3 複合体を、工程 (b) の混合物から分離する工程、  
を包含する、方法。

29. 前記 Bap タンパク質または前記 Bap/ $\beta$  3 複合体が固相支持体上に固定化される、請求項 28 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

インテグリンに結合し、そしてインテグリン媒介シグナル伝達に

関与するタンパク質、Bap-1の同定

## 関連出願

本出願は、1996年11月18日に出願された出願番号第08/753,038号の一部継続であり、本明細書によってその全体が参考として援用される。

## 発明の分野

本発明は、インテグリン媒介シグナル伝達、特に $\beta 3$ インテグリン（例えば、 $\alpha V\beta 3$ および $\alpha IIb\beta 3$ ）によって媒介されるシグナル伝達の分野に関する。詳細には、本発明は、仮にBap-1と名付けた新規のヒト遺伝子の同定に関する。Bap-1は、 $\alpha IIb$ または $\beta 3$ インテグリンの細胞質ドメイン、およびSrcキナーゼと相互作用するタンパク質Bap-1をコードし、そして $\beta 3$ インテグリン媒介シグナル伝達に関する。

## 発明の背景

インテグリンは、細胞の、細胞外マトリクスタンパク質および他の細胞への付着を媒介する $\alpha\beta$ ヘテロダイマーのファミリーである（Clarkら、Science 268:233-239, 1995）。インテグリンはまた、細胞活性化に応じて細胞表面インテグリンの付着親和性における変化（内側から外側へのシグナル伝達と呼ぶ）、またはインテグリン媒介付着後の細胞内シグナル伝達経路に影響を及ぼすこと（外側から内側へのシグナル伝達と呼ぶ）によって証明されるように、シグナル伝達に参加する。多くの生物学的応答（胚発生、うつ血、血餅収縮、有糸分裂、新脈管形成、細胞移動、炎症、免疫応答、白血球ホーミングおよび活性化、ファージサイトーシス、骨吸収、腫瘍増殖および転移、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、創傷治癒、ウイルス感染、アミロイド毒性、プログラムされた細胞死、ならびに力学的応力に対する細胞の応答を含む）は、インテグリン媒介接着および細胞移

動に少なくともある程度依存する。

インテグリンファミリーは、15の関連する公知の $\alpha$ サブユニット（ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 $\alpha E$ 、 $\alpha V$ 、 $\alpha IIb$ 、 $\alpha L$ 、 $\alpha M$ 、および $\alpha X$

）および8の関連する公知の $\beta$ サブユニット ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ , および $\beta 8$ ) からなる (Luscinskasら, FASEB J. 8:929-938, 1994)。インテグリン $\alpha$ および $\beta$ サブユニットは、種々の対形成で存在することが公知である。いくつかのインテグリンが同じリガンドに結合することが公知であるように、いくらか縮退が存在するが、インテグリンリガンド特異性は、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの特定の対形成によって決定される。 $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ , および $\beta 7$ サブユニットを含むほとんどのインテグリンは、シグナルを伝達することが見出されている (Hynes, Cell 69:11-25, 1992によって概説される)。インテグリンは、「内側から外側へ」および「外側から内側へ」の両方のシグナル伝達事象に関与する。

インテグリン関連欠陥に関連する種々の病理学が公知である。例えば、GP IIb-IIIa ( $\alpha$  IIb $\beta 3$ とも呼ばれる) の含量または機能の遺伝性欠損が記載されており (گرانツマン血小板無力症と呼ばれる)、これは接着性タンパク質に結合せず、従って凝集しない血小板によって特徴付けられ、寿命の長い出血素質を生じる。フィブリノーゲンおよびvon Willebrand因子のGP IIb-IIIaへの結合の阻害が記載されており、インビトロにおいて血小板凝集をブロックし、そしてインビボにおいて臨床的血栓症を阻害することが見出されている (The EPIC Investigators, New England Journal of Med. 330:956-961, 1994; J.E. Tchongら, Circulation 91:2151-2157, 1995)。また、白血球接着不全(LAD)は、 $\beta 2$ サブユニットの非存在から生じ、そして $\beta 2$ インテグリンリガンドに結合しない白血球によって特徴付けられ、感染に感受性である個体を生じる。

ほとんどの研究された血小板インテグリン $\alpha$  IIb $\beta 3$ (GPIIb/IIIa)は、ホメオスタシス (血小板凝集) およびまた血栓症において重要な役割を果たす。 $\alpha$  V $\beta 3$ は、黒色腫転移および新脈管形成 (これは、ガン細胞増殖に必須である) において重要な役割を果たす。 $\alpha$  IIb $\beta 3$ の付着能は、種々のアゴニスト (例えば、トロンビン、コラーゲン、およびADP) によって刺激されることが公知である。これは、内

側から外側へのシグナル伝達と称される。種々の細胞および組織 (血小板を含む

）において、インテグリンはまた、外側から細胞の内側へのシグナルを媒介し得、そしてこれらのシグナルが細胞プロセス（例えば、タンパク質チロシンリン酸化を刺激すること、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交互輸送を活性化すること、細胞骨格構造のアセンブリ、および細胞移動および増殖に関与する遺伝子発現を調節すること）を誘発し得ることを示唆する証拠が蓄積している。しかし、これらのシグナルが伝達する機構は、依然として理解されないままである。 $\alpha \text{IIb} \beta 3$ および他のインテグリンの細胞質テール(tail)が、アゴニスト刺激によって生成される細胞内シグナルに対する応答を介して細胞外ドメインのリガンド結合機能を調整すること（内側から外側へ）により、および細胞の生理学および病理学的機能において中心的な役割を果たし得る細胞内分子へのインテグリンレセプター占有によって誘発されるシグナルを媒介すること（外側から内側へ）によって、接着における重要な役割を果たし得るということが仮定されている。

#### A. 内側から外側へのシグナル伝達

内側から外側へのシグナル伝達は、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、および $\beta 3$ インテグリンについて観察されている(R. O. Hynes, Cell 69:11-25, 1992; D.R. Phillipsら, Cell 65:359-362, 1991, S.S. Smythら, Blood 81:2827-2843, 1993; M.H. Ginsbergら, Thromb. Haemostasis 70:87-93, 1993; R.L. JulianoおよびS. Haskill, J. Cell Biol. 120:577-585, 1993; E. Rouslahti, J. Clin. Invest. 87:1-5, 1991; Weberら, J. Cell Biol. 134:1063-1073, 1996)。

おそらく、内側から外側へのシグナル伝達に関与する最も広く研究されたインテグリンはGP IIb-IIIa、4つの接着性タンパク質についてのレセプター、フィブリノーゲン、von Willebrand因子、ビトロネクチン、および刺激された血小板に結合するフィブロネクチンである(D.R. Phillipsら, Blood 71:831-43, 1988)。接着性タンパク質のGP IIb-IIIaへの結合は、血小板凝集および正常なうっ血について必要とされ、そしてまた、高剪断(shear)動脈において閉塞性血栓症を担う。

GP IIb-IIIaは、内側から外側へのシグナル伝達に関与することが公知である。

なぜなら、非刺激血小板の表面上のGP IIb-IIIaは、固定化フィブリノーゲンのみを認識し得るからである。トロンビンのような薬剤による血小板刺激に応じて、コラーゲンおよびADP、GP IIb-IIIaは、上記の段落において同定された4つの接着性タンパク質に対するレセプターになり、そしてフィブリノーゲンおよびvon Willebrand因子の結合は、血小板が凝集するのを引き起こす。GP IIb-IIIaの活性化されたレセプター適合性状態を検出するモノクローナル抗体が記載されており、このことは、GP IIb-IIIaのレセプター適合性形態のコンフォメーションが、可溶性フィブリノーゲンまたはvon Willebrand因子を結合しないGP IIb-IIIaのそれと異なることを示す (S.J. Shattilら、J. Biol. Chem. 260:11107-11114, 1985)。内側から外側へのGP IIb-IIIaシグナル伝達は、GP IIb-IIIa活性を抑制または刺激するように作用する細胞タンパク質に依存することが仮定されている (M.H. Ginsbergら、Curr. Opin. Cell Biol. 4:766-771, 1992)。

白血球上の $\beta_2$ インテグリンはまた、例えば刺激されたリンパ球上のLFA-1( $\alpha_L\beta_2$ )の増加した結合活性、および刺激した好中球上のMAC-1( $\alpha_m\beta_2$ )の増加した結合活性の原因である内側から外側へのシグナル伝達に応答する (T. Springer, Curr. Biol. 4:506-517, 1994に概説される)。

#### B. 外側から内側へのシグナル伝達

ほとんどのインテグリンは、接着性タンパク質または抗体のインテグリンへの結合が多くの細胞の働き (例えば、細胞分化)、細胞活性の種々の標識、遺伝子発現、および細胞増殖に影響を及ぼすことを示す観察によって証明されるように (R.O. Hynes, Cell 69:11-25, 1992)、外側から内側への伝達に関与し得る。外側から内側へのシグナル伝達におけるGP IIb-IIIaの関与は、固定化フィブリノーゲンへの非刺激血小板の結合 (GP IIb-IIIaによって媒介されるプロセス) が、血小板活性および血小板拡散を導くので、明白である (N. KiefferおよびD.R. Phillips, J. Cell. Biol. 113:451-461, 1991; Haimovichら、J. Biol. Chem. 268:15868-15877, 1993)。

GP IIb-IIIaを介する外側から内側へのシグナル伝達はまた、血小板凝集の間に生じる。刺激された血小板の表面上のGP IIb-IIIaの活性化形態に結合され、



血小板-血小板接触の形成と組み合わせられるフィブリノーゲンまたはvon Willebrand因子がGP IIb-IIIaシグナル伝達を介する血小板刺激をさらに引き起こすため、シグナル伝達が生じる。この様式において、GP IIb-IIIaへの接着性タンパク質の結合は、血小板刺激を開始し得るか、または、ADP、トロンビン、およびコラーゲンのような他の血小板アゴニストによって誘導される刺激を増強させ得る。非刺激血小板上のGP IIb-IIIaへの可溶性フィブリノーゲンの結合はまた、LIBS6のような選択されたGP IIb-IIIa抗体によって誘導され得る(M-M. Huangら、J. Cell Biol. 122:473-483, 1993)：この様式において結合されるフィブリノーゲンを有する結合は刺激されるときは考えられないが、そのような血小板は撓拌される場合に凝集し、そしてGP IIb-IIIaシグナル伝達を介する凝集後に刺激されるようになる。

外側から内側へのインテグリンシグナル伝達は、細胞内の1つ以上のカスケードの活性化を生じる。GP IIb-IIIaについて、インテグリン結合によって引き起こされる効果は、増強されたアクチン重合体化、増加した $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換、ホスホリパーゼの活性化、増加したホスファチジルターンオーバー、増加した細胞質 $\text{Ca}^{2+}$ 、およびキナーゼの活性化を含む。活性化されることが公知のキナーゼは、PKC、ミオシン軽鎖キナーゼ、src、syk、およびpp125FAKを含む。同定されたキナーゼ物質は、プレクストリン、ミオシン軽鎖、src、syk、pp125FAK、および未だ同定されていない多くのタンパクを含む(E.A. ClarkおよびJ.S. Brugge, Sci. 268:233-239, 1995において概説される)。リン酸化を含むこれらのシグナル伝達事象の多くはまた、他のインテグリンの結合に応じて生じる(R.O. Hynes, Cell 69:11-25, 1992において概説される)。これらの他のインテグリンは、リガンド特異性を可能にする異なる配列および異なる $\alpha$ - $\beta$ 対形成を有するが、種間およびサブユニット間の両方の比較的小さな細胞質ドメインの高度に保存された性質は、関連する機構が、多くのインテグリンの伝達機構を担うことを予測する。

### C. シグナル伝達

インテグリンシグナル伝達におけるGP IIb-IIIaの細胞質ドメインの関与は、変異誘発実験から推定される。GP IIbの細胞質ドメインの欠失は、野生型複合体

と等しい親和性でフィブリノーゲンに結合する構成的に活性なレセプターを生じ、このことは、GP IIbの細胞質テールが調節的役割を有することを意味する (T. E. O'Tooleら, *Cell Regul.* 1:883-893, 1990)。GP IIb-IIIaの点変異、欠失および他の短縮は、GP IIb-IIIaのリガンド結合活性およびそのシグナル伝達応答に影響を及ぼす (P.E. Hughesら, *J. Biol. Chem.* 270:12411-12417, 1995; J. Ylänneら, *J. Biol. Chem.* 270:9550-9557, 1995)。

GP IIbではなくGP IIIaの細胞質ドメインを含むキメラの膜貫通タンパク質は、GP IIb-IIIaの機能を阻害し (Y. P. Chenら, *J. Cell. Biol.* 269:18307-18310, 1994)、このことは、遊離GP IIIa細胞質ドメインが、正常GP IIb-IIIa機能に必要なタンパク質を細胞内で結合することを意味する。いくつかのタンパク質は、GP IIbまたはGP IIIaの膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインのいずれかを結合することが示されている。

テトラスパニン (tetraspanin) ファミリーのタンパク質のメンバーであるCD-9 (F. Lanzaら, *J. Biol. Chem.* 266:10638-10645, 1991) は、凝集した血小板においてGP IIb-IIIaと相互作用することが見い出された。 $\beta$ 3-エンドネキシン (endonexin)、GP IIIaの細胞質ドメインを「ペイト」として使用するツーハイブリッドスクリーニングにより同定されたタンパク質は、GP IIIaの細胞質テールと、直接および選択的に相互作用することが見い出されている (S. Shattilら, *J. Cell. Biol.* 131:807-816, 1995)。 $\beta$ 3-エンドネキシンは、血小板無力症S752-P変異を含むGP IIIa細胞質ドメインへの減少した結合を示す。これらのGP IIIa結合タンパク質のいずれかがシグナル伝達に関与するか否かはまだ知られていない。

GP IIIa細胞質ドメイン配列でインテグリンと相互作用し得る、 $\alpha$ V $\beta$ 3に結合する細胞質タンパク質もまた記載されている。Bartfeldおよび共同研究者ら (N. S. Bartfeldら, *J. Biol. Chem.* 268:17270-17276, 1993) は、界面活性剤溶解物からの免疫沈降を使用し、分子量190kDaタンパク質が、PDGF刺激3T3細胞由来の $\alpha$ V $\beta$ 3インテグリンと結合することを示した。IRS-1は、ヒトインスリンレセプターをコードするDNAで安定にトランスフェクトされたRat-1細胞のインスリン刺激後、 $\alpha$ V $\beta$ 3インテグリンに結合することが見い出された (K. VuoriおよびE

Ruoslahti, Sci. 266:1576-1578, 1994)。Kolanusら (Cell 86:233-242, 1996) は、サイトヘシン-1 (Cytohesin-1) を最近同定した。サイトヘシン-1は、インテグリン  $\beta$  2鎖の細胞内部分に特異的に結合し、そしてサイトヘシン-1の過剰発現は、Jarkat細胞の ICAM-1への  $\beta$  2インテグリン依存性結合を誘導する。新規のセリン/スレオニンキナーゼ、ILK-1は、 $\beta$  1細胞質ドメインと結合することが見い出された (Hanniganら、Nature 379:91-96, 1996)。ILK-1の過剰発現は、インテグリンリガンドであるフィブロネクチン、ラミニン、およびビトロネクチンへの接着を阻害する。

接着性タンパク質へのインテグリン結合およびインテグリンシグナル伝達は、上で同定されたように、広範な種々の生理学的役割を有する。インテグリンによって増強されたシグナル伝達は、増強した細胞移動性および増殖、増強した細胞応答性、および形態学的形質転換における調整を引き起こす、増大した細胞接着および細胞内シグナル伝達分子の活性化を可能にする。細胞性機能を担うインテグリンが記載されており、そしてシグナル伝達事象が解明され始めたが、インテグリンがシグナルを伝達するメカニズムは決定されないままである。

$\beta$  3インテグリンの細胞質テールによって媒介される、内側から外へ、および外側から内へのシグナル伝達役割の分子メカニズムを理解することは、インテグリンの細胞内テールと相互作用する細胞内分子の同定を必要とする。 $\alpha$ -アクチニンが、インビトロで  $\beta$  1テールに結合することが報告されている (Oteyら、J. Biol. Chem. 268:21193-21197, 1993) が、これらの結合の機能的関連性は明白ではない。酵母ツーハイブリッドを使用することによって、ILK-1は  $\beta$  1相互作用タンパク質と同定されたが、ILK-1は  $\beta$  3に結合しない (Hanniganら、Nature 379:91-96(1996))。本発明は、タンパク質Bap-1 (これは、インテグリンサブユニット  $\alpha$  IIおよび  $\beta$  3細胞質テールに結合する) をコードする新規のヒト遺伝子Bap-1の分子クローニングを記載する。Bap-1はまた、Srcキナーゼと結合することが見い出されている。Bap-1の分子単離は、インテグリン媒介シグナル伝達を調整する治療剤の開発の基礎を形成する。

## 発明の要旨

本発明は、インテグリンの $\beta^3$ サブユニットの細胞質ドメインに結合するタンパク質（本明細書中以下Bap-1またはBap-1タンパク質）の単離および同定に、部分的に基づく。Bap-1は、続いて $\alpha$ IIbサブユニットの細胞質ドメインおよびSrcキナーゼと結合することが実証された。この観察に基づいて、本発明は、このような結合のため種々の方法に有用である精製Bap-1タンパク質を提供する。

本発明は、Bap-1タンパク質をコードする核酸分子をさらに提供する。このような核酸分子は単離形態であり得るか、または発現制御エレメントまたはベクター配列に作動可能に連結され得る。

本発明は、Bap-1および／またはBapファミリーのタンパク質の他のメンバーを同定する方法をさらに提供する。特に、Bap-1の核酸配列は、Bap-1またはBapのタンパク質ファミリーの他のメンバーをコードする核酸分子を同定する方法において、プローブとして、またはPCRプライマーを作製するために使用され得る。

本発明は、Bap-1に結合する抗体をさらに提供する。このような抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかであり得る。抗Bap-1抗体は、種々の診断形式において、および種々の治療方法に使用され得る。

本発明は、インテグリンの細胞質シグナル伝達パートナーとの結合を低減またはブロックするための方法をさらに提供する。特に、インテグリンの細胞質シグナル伝達パートナー（例えば、Bap-1もしくはBap-1シグナル伝達パートナー複合体（例えば、Bap-1/Srcキナーゼ））との結合は、 $\beta^3$ もしくは $\alpha$ IIbサブユニットを有するインテグリンと、インテグリンに対するBap-1もしくはBap-1シグナル伝達パートナー複合体の結合をブロックする薬剤との接触によって、ブロックされるかまたは減少され得る。この方法は、インテグリンの細胞質ドメインに結合する薬剤、またはBap-1もしくはBap-1/Src複合体のようなBap-1シグナル伝達パートナー複合体に結合する薬剤を利用し得る。

インテグリン/Bap-1の結合をブロックすることは、インテグリン媒介シグナルを必要とする生物学的および病理学的プロセスを調整するために使用され得る。このような方法および薬剤は、基質または別の細胞への付着および接着、細胞移動、細胞増殖および細胞分化を調整するために使用され得る。これらの作用に

関

与する病理学的プロセスには、血栓症、炎症、腫瘍転移、創傷治療、および上記の他のものが含まれる。

本発明は、Bap-1またはBap-1/ $\beta$ 3複合体に結合するインテグリンシグナル伝達パートナーを単離する方法をさらに提供する。インテグリンシグナル伝達パートナーは、捕獲プローブとしてBap-1タンパク質またはBap-1/ $\beta$ 3複合体を使用して単離される。特に、Bap-1タンパク質、もしくはそのフラグメント、またはBap-1/ $\beta$ 3複合体は、Bap-1タンパク質、フラグメント、または複合体のシグナル伝達パートナーとの結合を可能にする条件下で、インテグリン発現細胞から調製された抽出物と混合される。非結合細胞構成物は混合物から除去され、そしてシグナル伝達パートナーは捕獲プローブから遊離される。あるいは、Bap-1は、発現ライブラリーをスクリーニングするため、およびBap-1タンパク質に結合する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を同定するために、酵母ツーハイブリッド系においてベイトとして使用され得る。これらの方法によって単離されたシグナル伝達パートナーは、抗体の調製において有用であり、そしてまた薬物開発の標識として作用する。

本発明は、インテグリンのBap-1またはシグナル伝達複合体との結合をブロックまたは調整し得る薬剤を同定する方法をさらに提供する。特に、薬剤は、Bap-1タンパク質またはそのフラグメントを $\beta$ 3インテグリンおよび試験薬剤とインキュベートすること、ならびに試験薬剤がBap-1タンパク質の $\beta$ 3インテグリンへの結合をブロックまたは低減するか否かを決定することによって、インテグリンのBap-1またはシグナル伝達複合体との結合をブロック、低減、またはそうでなければ調整する能力について試験され得る。アゴニスト、アンタゴニスト、および他のモジュレーターは、明白に意図される。

Bap-1/インテグリン相互作用を必要とする生物学および病理学的プロセスは、遺伝子治療法を使用してさらに調整され得る。生物中のさらなる遺伝子操作は、動物モデルにおいて、Bap-1遺伝子の発現またはBap-1タンパク質の産生を変化させるために使用され得る。例えば、Bap-1遺伝子は、Bap-1欠損個体に導入され

、遺伝子欠損を正し得；Bap-1活性のペプチドモジュレーターは、遺伝子形質転換法を用いて標的細胞内で産生され、標的細胞へモジュレーターをコードする核酸

分子を導入し得；そしてBap-1は非ヒト哺乳動物において不活化され、Bap-1欠損の動物モデルにを作製し得る。後者の適用であるBap-1欠損動物は、Bap-1活性を調整する薬剤、およびBap-1と相互作用するタンパク質をコードする他の遺伝子を同定するに特に有用である。アンチセンスおよび三重ヘリックス治療および介入のための核酸の使用は明白に、意図される。

本発明は、インテグリン媒介シグナル伝達を必要とする病理学的プロセスの重篤性を低減する方法をさらに提供する。Bap-1またはBap-1複合体の $\beta$ 3インテグリンとの結合は、インテグリン媒介シグナル伝達に必要であるので、インテグリン/Bap-1結合をブロックする薬剤は、治療方法において使用され得る。

図面の簡単な説明

図1A～1Bは、ヒトBap-1の核酸配列およびヒトBap-1のアミノ酸配列を示す。

図2A～2Bは、マウスBap-1の部分的核酸およびマウスBap-1のアミノ酸配列を示す。

図3は、Flag-タグBap-1から産生された欠失変異体を示す。

図4は、NF- $\kappa$ B-CAT融合体の発現に対する全長または欠失変異体のFlag-タグBap-1の発現の効果を要約する。

図5は、AP-1-CAT融合体の発現に対する、全長または欠失変異体のFlag-タグBap-1の発現の効果を要約する。

好ましい実施態様の詳細な説明

#### I. 一般的記載

本発明は、 $\beta$ 3インテグリンに結合し、かつインテグリン媒介シグナル伝達に関与するタンパク質（本明細書中以下、Bap-1タンパク質）を同定することに、部分的に基づく。Bap-1はまた、 $\alpha$ IIbの細胞質テールおよびSrcキナーゼと結合することが見い出されている。

Bap-1タンパク質は、インテグリン媒介シグナル伝達を阻害して、例えば、GP

IIb-IIIaまたは $\alpha V\beta 3$ シグナル伝達を必要とする生物学的プロセスを阻害するために使用され得る薬剤として使用され得るか、またはそのような薬剤に対する標的として働き得る。

本発明は、Bap-1またはBap-1/ $\beta 3$ またはBap-1/Srcキナーゼ複合体に結合するタンパク質を単離する方法の開発にさらに基づく。Bap-1タンパク質に基づくプローブは、Bap-1/インテグリン結合シグナル伝達タンパク質を単離するための捕獲プローブとして使用される。優位ネガティブタンパク質、これらのタンパク質をコードするDNA、これらのシグナル伝達タンパク質に対する抗体、これらのタンパク質のペプチドフラグメント、またはこれらのタンパク質の模倣物は、インテグリン機能に影響を及ぼすために細胞へ導入され得る。さらに、これらのタンパク質は、インテグリン機能を調節するための新規の治療剤を発見するための、合成小分子、およびコンビナトリアルまたは天然に存在する化合物ライブラリーのスクリーニングのための新規の標的を提供する。

## II. 特定の実施態様

### A. Bap-1タンパク質

本発明は、単離されたBap-1タンパク質、ならびにBap-1タンパク質の対立遺伝子変異体、およびBap-1タンパク質の保存的アミノ酸置換体を提供する。本明細書において使用する場合、Bap-1タンパク質(またはBap-1)とは、図1に示されるヒトBap-1タンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。Bap-1タンパク質には、Bap-1の天然に存在する対立遺伝子変異体、具体的に上記で示した配列とは僅かに異なるアミノ酸配列を有するタンパク質が含まれる。対立遺伝子変異体は、上記の配列とは僅かに異なるアミノ酸配列を有するが、問題のシグナル伝達カスケードの部分として不可欠である $\beta 3$ インテグリンと結合する能力をなお有する。

本明細書において使用される場合、Bap-1ファミリーのタンパク質とは、ヒトに加えて生物から単離されたBap-1タンパク質をいう。Bap-1ファミリーのタンパク質の1つのこのようなメンバーは、マウスBap-1タンパク質である。その部分アミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、図2に示される。Bap-1ファミリーの

タンパク質の他のメンバーを同定および単離するために使用される方法は、下記および実施例10に記載される。

本明細書において使用される場合、Bapファミリーのタンパク質とは、 $\beta$ 3インテグリンと結合するタンパク質をいい、これはBap-1と構造的に関連し、Bap-1に対して顕著な配列相同性を有する。Bapファミリーのタンパク質のメンバーは、インテグリン媒介シグナル伝達に関与する。簡便のために、Bap-1タンパク質、Bap-1ファミリーのタンパク質のメンバー、およびBapファミリーのタンパク質のメンバーは、以後、本発明のBapタンパク質と呼ぶ。

本発明のBapタンパク質は、好ましくは、単離形態である。本明細書において、使用される場合、タンパク質は、物理的、機械的または化学的方法が使用されて、Bapタンパク質を、通常はBapタンパク質と結合している細胞構成物から取り出した場合、単離されたといわれる。当業者は、単離されたBapタンパク質を得るために標準的な精製方法を容易に使用し得る。

本発明のBapタンパク質には、本明細書に記載されるBapタンパク質の保存的改変体がさらに含まれる。本明細書において使用される場合、保存的改変体とは、 $\beta$ 3インテグリンに結合しそしてシグナル伝達を媒介するBapタンパク質の能力に不利に影響しない、アミノ酸配列の改変体をいう。置換、挿入または欠失は、改変された配列が、Bapタンパク質が $\beta$ 3プロテグリンと結合するのを妨げる場合、Bapタンパク質に不利に影響するといわれる。例えば、Bapの全体電荷、構造または疎水性/親水性特性は、Bapの活性に不利に影響することなく、改変され得る。したがって、Bapのアミノ酸配列は、 $\beta$ 3インテグリンと結合するようになるペプチドの能力に不利に影響することなく、例えば、ペプチドをより疎水性または親水性にするように改変され得る。

通常、対立遺伝子変異体、保存的置換改変体、Bapファミリーのタンパク質のメンバー、および特にBap-1ファミリータンパク質のメンバーは、ヒトまたはマウスのBap-1配列と、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、なおより好ましくは少なくとも90%、そして最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。このような配列に関する同一性また



は相同性は、本明細書において、配列を整列させ、必要であれば、最大の%相同性を達成するようにギャップを導入した後、配列同一性の部分としていずれの保存的置換も考慮せずに、候補配列中の公知のペプチドと同一であるアミノ酸残基

の割合と定義される。ペプチド配列への、N末端、C末端、または内部伸長、欠失、または挿入は、相同性に影響すると解釈されるべきでない。

したがって、本発明のBapタンパク質には、図1に開示されたアミノ酸配列を有する分子；Bap-1タンパク質の少なくとも約3、5、10、または15アミノ酸の保存的配列を有するそのフラグメント；このような配列のアミノ酸配列改変体（ここで、アミノ酸残基が、開示されたBap-1配列に対してNまたはC末端に、またはこの配列内に挿入されている）；開示されたBap-1配列のアミノ酸配列改変体または上記の定義のように、ここで、アミノ酸残基が、開示されたBap-1配列に対してNまたはC末端に、または別の残基が置換されているそのフラグメントが含まれる。意図される改変体には、例えば、相同組換え、部位特異的またはPCR変異誘発による予め決定された変異を含む変異体、および他の動物種（ウサギ、ラット、マウス、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、および非ヒト霊長類種を含むがこれらに限定されない）の対応するBapタンパク質、ならびにのBapファミリータンパク質の対立遺伝子または天然に存在する変異体、および誘導体（ここで、Bapタンパク質は、天然に存在するアミノ酸以外の部分（例えば、酵素または放射性同位体のような検出可能な部分）を用いる置換、化学的、酵素的または他の適切な手段によって共有結的に改変されている）がさらに含まれる。

下記のように、Bapファミリータンパク質のメンバーは、1) Bap-1またはBap-1/ $\beta$  3複合体に結合する他のインテグリンシグナル伝達パートナーを同定および単離するために、2) インテグリンとBap-1またはBap-1/シグナル伝達複合体との結合をブロックする薬剤を同定するための方法において、3) インテグリン媒介シグナル伝達についてアッセイする標的として、および4) インテグリンとBap-1またはBap-1/シグナル伝達複合体との結合をブロックする治療薬剤として、使用され得る。

B. Bap-1をコードする核酸分子

本発明はさらに、Bap-1および本明細書において開示された関連するBapタンパク質をコードする核酸分子を、好ましくは単離形態で提供する。本明細書において、使用される場合、「核酸」は、上記定義のペプチドをコードするか、またはそ

のようなペプチドをコードする核酸配列に相補的であるか、またはこのような核酸とハイブリダイズし、そして適切にストリンジェントな条件下で、これに安定に結合したままであるか、またはペプチド配列と、少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、そしてより好ましくは少なくとも85%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする、RNAまたはDNAと定義される。天然の供給源に由来するかまたは合成されたかに拘わらず、ゲノムDNA、cDNA、mRNAおよびアンチセンス分子、ならびに別の骨格をベースにするかまたは別の塩基を含む核酸が具体的に意図される。しかし、このようなハイブリダイズする核酸または相補的核酸は、さらに、いずれの先行技術の核酸に対しても新規であり、自明でないとして定義され、本発明のBapタンパク質をコードするか、適切にストリンジェントな条件下で本発明のBapタンパク質をコードする核酸とハイブリダイズするか、本発明のBapタンパク質をコードする核酸と相補的である核酸を含むと定義される。

「ストリンジェントな条件」は、(1)洗浄のために、低イオン強度および高温、例えば、50℃の0.015M NaCl/0.0015Mクエン酸ナトリウム(sodium titrate)/0.1% SDSを用いるか、または(2)ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドのような変性剤、例えば、42℃の750mM NaCl、75mMクエン酸ナトリウムを含む0.1% ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1% ポリビニルピロリドン/50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を含む50% (容量/容量)ホルムアミドを用いる条件である。別の例は、42℃の50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5×Denhardt溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50Tg/ml)、0.1% SDS、および10%硫酸デキストランの使用、0.2×SSCおよび0.1% SDS中で42℃にての洗浄である。当業者は、明瞭で検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを得るために、ストリンジェントな条件を適切に、容易に決定しそして変化させ得る。

本明細書において使用する場合、核酸分子は、核酸分子が、核酸の供給源から

、他のポリペプチドをコードする挟雑核酸と実質的に分離されている場合、「単離」されているといわれる。

本発明はさらに、Bapコード核酸分子のフラグメントを提供する。本明細書において、Bapコード核酸分子のフラグメントとは、全体タンパク質をコードする

配列の小さな部分をいう。フラグメントのサイズは、意図される使用によって決定される。例えば、フラグメントが、Bapタンパク質の活性部分をコードするように選択される場合、フラグメントはBapタンパク質の機能的領域をコードするに十分な大きさである必要がある。フラグメントが核酸プローブまたはPCRプライマーとして使用される場合、フラグメントの長さは、プロービング/プライミングの間に比較的小数の疑陽性を得るように選択される。フラグメントが、 $\beta$  3 インテグリンと結合するように選択される場合、長さは、Bapタンパク質上の $\beta$  接触部位を含むように選択される。

プローブ、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためかもしくはBap-1タンパク質をコードする遺伝子配列を合成するための特異的なプライマーとして使用される、本発明のBapコード核酸分子のフラグメント(すなわち、合成オリゴヌクレオチド)は、化学的技術(例えば、Matteucciら(J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981)のホスホトリエステル法)によるか、または自動合成法を使用して容易に合成され得る。さらに、より大きなDNAセグメントは、周知の方法(例えば、Bap遺伝子の種々のモジュラーセグメントを規定する一群のオリゴヌクレオチドの合成、続いて完全に改変されたBap遺伝子を組み立てるためのオリゴヌクレオチドの連結)によって容易に調製され得る。

本発明のBapコード核酸分子は、診断およびプローブ目的のために、検出可能な標識を含むようにさらに改変され得る。種々のこのような標識が当該分野において公知であり、そして本明細書に開示されるBapコード分子とともに容易に用いられ得る。適切な標識には、ビオチン、放射標識ヌクレオチドなどが含まれるが、これらに限定されない。当業者は、標識されたBapコード核酸分子を得るために、当該分野において公知の任意の標識を使用し得る。

翻訳の間にタンパク質配列中に取り込まれたアミノ酸の欠失、付加、変更によ

る一次配列自体に対する改変は、タンパク質の活性を破壊することなくなされ得る。このような置換または他の変更は、本発明の意図される範囲に該当するDNAによってコードされるアミノ酸配列を有するタンパク質を生じる。

#### C. 他のBapをコードする核酸分子の単離

上記のように、ヒトおよびマウスBap-1をコードする核酸分子の同定は、当業者に、本明細書中に記載されるヒトおよびマウス配列に加えて、Bap-1ファミリーのタンパク質の他のメンバーをコードする核酸分子を単離することを可能にさせる。さらに、現在開示された核酸分子は、当業者にBap-1に加えてBapファミリーのタンパク質の他のメンバーをコードする核酸分子を単離することを可能にさせる。

本質的に、当業者は、インテグリンシグナル伝達に関与する細胞から調製された発現ライブラリーをスクリーニングするための抗体プローブを産生するために、Bap-1のアミノ酸配列を容易に使用し得る。代表的に、精製Bap-1タンパク質（下記のような）で免疫されたウサギのような哺乳動物由来のポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体は、Bap-1の適切なコード配列、またはBapファミリーのタンパク質の他のメンバーを得るために、哺乳動物cDNAまたはゲノム発現ライブラリー（例えば、 $\lambda$ gt11ライブラリー）をプローブするのに使用され得る。クローン化cDNA配列は、融合タンパク質として発現されるか、それ自身の制御配列を用いて直接的に発現されるか、または酵素の発現に使用される特定の宿主に適切な制御配列を用いる構築物によって発現され得る。図1は、Bap-1タンパク質配列に見出される重要な抗原性および/または推定上の作用ドメインを同定する。このような領域は、プローブ、診断用の、および治療用の抗体の産生のためのBap-1タンパク質の抗原性部分の好ましい供給源である。

あるいは、本明細書中に記載されるBap-1コード配列の部分は、合成され、そしてインテグリン媒介性シグナル伝達経路を保有する任意の哺乳類生物由来のBap-1ファミリーのタンパク質をコードするDNAを回収するためのプローブとして使用され得る。約18~20ヌクレオチドを含有するオリゴマー（約6~7のアミノ酸ストレッチをコードする）は、ストリンジェントな条件下で、または過度のレベ

ルの偽陽性を除去するのに十分なストリンジエンシーの条件下でハイブリダイゼーションを得るために、調製され、そしてゲノムDNAまたはcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用される。

さらに、対のオリゴヌクレオチドプライマーが、Bapコード核酸分子を選択的

にクローン化するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) における使用のために調製され得る。このようなPCRプライマーを使用するためのPCR変性/アニール/伸長サイクルは、当該分野で周知であり、そして他のBapをコードする核酸分子を単離することにおいて使用するために容易に適合され得る。図1は、プローブまたはプライマーとして使用するのに特に良好に適切であるヒトBap-1遺伝子の領域を同定する。

#### D. Bapコード核酸分子を含有するrDNA分子

本発明は、Bapコード配列を含有する組換えDNA分子 (rDNA) をさらに提供する。本明細書で使用される場合、rDNA分子は、インサイチュで分子操作を受けているDNA分子である。rDNA分子を産生するための方法は、当該分野で周知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning (1989) を参照のこと。好ましいrDNA分子において、BapコードDNA配列は、発現制御配列および/またはベクター配列に作動可能に連結される。

本発明のBapコード配列の1つが作動可能に連結されるベクターおよび/または発現制御配列の選択は、当該分野で周知であるように、所望される機能的特性 (例えば、タンパク質発現)、および形質転換されるべき宿主細胞に直接的に依存する。本発明によって意図されるベクターは、少なくとも、宿主染色体に複製または挿入を指向し得、そして好ましくは、rDNA分子に含まれるBap構造遺伝子の発現をも指向し得る。

作動可能に連結したタンパク質コード配列の発現を調節するために使用される発現制御エレメントは、当該分野で公知であり、そして誘導性プロモーター、構成のプロモーター、分泌シグナル、および他の調節エレメントが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、誘導性プロモーターは容易に制御される (例えば、宿主細胞の培地中の栄養素に応答する)。

1つの実施態様において、Bapコード核酸分子を含有するバクテリヤは、原核生物のレプリコン（すなわち、それにより形質転換された原核生物宿主細胞（例えば、細菌宿主細胞）における染色体外での組換えDNA分子の自律複製および維持を行う能力を有するDNA配列）を含む。このようなレプリコンは当該分野で周知

である。さらに、原核生物のレプリコンを含有するバクテリヤはまた、その発現が薬物耐性のような検出マーカーを付与する遺伝子を含み得る。代表的な細菌の薬物耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子である。

原核生物レプリコンを含むバクテリヤは、細菌宿主細胞（例えば、E.coli）におけるBapコード遺伝子配列の発現（転写および翻訳）を指向し得る、原核生物またはウイルスのプロモーターをさらに含み得る。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合および転写が起こることを許容するDNA配列によって形成される発現制御エレメントである。細菌宿主に適合性であるプロモーター配列は、代表的には、本発明のDNAセグメントの挿入に好都合な制限部位を含有するプラスミドバクテリヤ中に提供される。このようなバクテリヤプラスミドの代表は、Biorad Laboratories, (Richmond, CA)から入手可能なpUC8、pUC9、pBR322およびpBR329、Pharmacia, Piscataway, NJから入手可能なpPLおよびpKK223である。

真核生物細胞と適合性である発現バクテリヤ（好ましくは、脊椎動物細胞と適合性である発現バクテリヤ）はまた、Bapコード配列を含むrDNA分子を形成するために使用され得る。真核生物細胞発現バクテリヤは、当該分野で周知であり、そしていくつかの市販の供給源から入手可能である。代表的には、このようなバクテリヤは、所望のDNAセグメントの挿入に好都合な制限部位を含有するように提供される。このようなバクテリヤの代表は、PSVLおよびPKSV-10 (Pharmacia)、pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.)、pTDT1 (ATCC, #31255)、本明細書中に記載されるバクテリヤpCDM8、および同様の真核生物発現バクテリヤである。

本発明のrDNA分子を構築するために使用される真核生物細胞発現バクテリヤは、真核生物細胞において効果的である選択マーカー（好ましくは、薬物耐性選択マ

ーカー)をさらに含み得る。好ましい薬物耐性マーカーは、その発現がネオマイシン耐性を生じる遺伝子(すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子)である(Southernら、J.Mol.Anal.Genet. 1:327-341, 1982)。あるいは、選択マーカーは、別のプラスミドに存在し得、そして2つのベクターは、宿主細胞の同時トランスフェクションによって導入され、そして選択マーカーのための適切な薬物中で培養することによって選択される。

#### E. 外的に供給されたBapコード核酸分子を含有する宿主細胞

本発明は、本発明のBapタンパク質をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞をさらに提供する。宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれかであり得る。Bap-1タンパク質の発現に有用な真核生物細胞は、細胞株が細胞培養法に適合し、そして発現ベクターの増殖およびBap-1遺伝子産物の発現に適合する限り、限定されない。好ましい真核生物宿主細胞としては、酵母、昆虫および哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、サルまたはヒト線維芽細胞性細胞株由来の細胞のような脊椎動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい真核生物宿主細胞としては、ATCCからCCL61として入手可能なチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ATCCからCRL 1658として入手可能なNIH Swissマウス胎仔細胞NIH/3T3、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、および同様の真核生物組織培養細胞株が挙げられる。

任意の原核生物宿主が、BapコードrDNA分子を発現するために使用され得る。好ましい原核生物宿主はE.coliである。

本発明のrDNA分子での適切な細胞宿主の形質転換は、代表的には使用されるベクターの型および使用される宿主系に依存する周知の方法によって達成される。原核生物宿主細胞の形質転換に関して、エレクトロポレーションおよび塩処理法が代表的に使用される(例えば、Cohenら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69:2110, 1972;およびManiatisら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1982)を参照のこと)。rDNAを含有するベクターでの脊椎動物細胞の形質転換に関して、エレクトロポレーション、カチオン性脂質または塩処理法が代表的に使用される(例えば、Grahamら、

Viro1.52:456, 1973; Wiglerら, Proc.Nat1.Acad.Sci.USA 76:1373-76, 1979を参照のこと)。

首尾良く形質転換された細胞(すなわち、本発明のrDNA分子を含有する細胞)は、周知の技術によって同定され得る。例えば、本発明のrDNAの導入から生じる細胞は、単一コロニーを産生するためにクローン化され得る。これらのコロニーに由来する細胞が、回収され、溶解され、そしてSouthern, J.Mol.Biol. 98:503, 1975

またはBerentら, Blotech, 3:208, 1985に記載されるような方法を用いて、rDNAの存在についてそれらのDNA内容が試験されるか、またはこの細胞から産生されたタンパク質が免疫学的方法によりアッセイされる。

F. Bapタンパク質をコードするrDNA分子を用いるBapの産生

本発明はさらに、本明細書中に記載されるBapコード核酸分子の1つを使用する、Bapタンパク質を産生するための方法を提供する。一般的な用語において、組換え形態のBapタンパク質の産生は、代表的に以下の工程を含む：

第1に、核酸は、図1に示される核酸分子のような、Bapタンパク質をコードする核酸分子が得られる。Bapコード配列がイントロンによって中断されない場合、それは、任意の宿主における発現に直接的に適切である。

次いで、Bapコード核酸分子は、好ましくは、上記のような適切な制御配列と作動可能に連結して配置されて、Bapコード配列を含有する発現ユニットが形成される。発現ユニットは、適切な宿主を形質転換するために使用され、そして形質転換宿主は、Bapタンパク質の産生を可能にする条件下で培養される。必要に応じて、Bap-1タンパク質が、培地または細胞から単離される；タンパク質の回収および精製は、幾分かの不純物が許容され得るいくつかの場合には、必要とされないかもしれない。

前述の工程の各々は、種々の方法で行われ得る。例えば、所望のコード配列は、ゲノムフラグメントから入手され得、そして適切な宿主中で直接的に使用され得る。種々の宿主において作動可能である発現ベクターの構築は、上記のような適切なレプリコンおよび制御配列を用いて達成される。制御配列、発現ベクター



、および形質転換法は、遺伝子を発現するために使用される宿主細胞の型に依存し、そして上記に詳細に考察された。適切な制限部位は、通常利用可能でない場合、コード配列の末端に添加され、その結果、これらのベクターに挿入するための切り出し可能な遺伝子を提供し得る。当業者は、Bapタンパク質を産生するためのBapコード配列とともに使用するために、当該分野で公知の任意の宿主/発現系を容易に適合させ得る。

#### G. 他のインテグリンシグナル伝達パートナーを同定する方法

本発明の別の実施態様は、インテグリンの細胞質シグナル伝達パートナーの単離および同定の際に使用するための方法を提供する。詳細には、Bapタンパク質単独、または $\beta$ 3サブユニットを含むインテグリン（本明細書中以下、Bap/ $\beta$ 3複合体）との組合せが、インテグリンを発現する細胞からのBapまたはBap/ $\beta$ 3に結合するシグナル伝達パートナーを同定するために用いられ得る。

詳細には、Bapタンパク質単独、または $\beta$ 3サブユニットを含むインテグリン（すなわち、Bap/ $\beta$ 3複合体）との組合せが、インテグリンを細胞の抽出物または画分と、シグナル伝達パートナーとBapまたはBap/ $\beta$ 3複合体との会合を可能にする条件下で混合される。混合後、Bap-1またはBap-1/ $\beta$ 3複合体と会合したペプチドは、混合物から分離される。次いで、Bap-1またはBap-1/ $\beta$ 3複合体に結合したシグナル伝達パートナーは、取り出され、さらに分析され得る。

シグナル伝達パートナーを単離および同定するために、Bapタンパク質全体が用いられ得る。あるいは、Bapタンパク質のフラグメントが用いられ得る。

本明細書中で用いられる、細胞抽出物とは、溶解または破壊された細胞から作製される調製物または画分をいう。細胞抽出物の好ましい供給源は、天然で $\beta$ 3インテグリンを発現する細胞である。このような細胞の例は、血小板および白血球を含むがこれらに限定されない。

細胞の抽出物を得るために種々の方法が用いられ得る。細胞は、物理的または化学的破壊方法を用いて破壊され得る。物理的破壊方法の例は、超音波処理および機械的剪断を含むがこれらに限定されない。化学的溶解法の例は、界面活性剤溶解および酵素溶解を含むがこれらに限定されない。当業者は、本発明における

使用のための抽出物を得るように、細胞抽出物を得る方法を容易に適應させ得る。

細胞抽出物は、被験体から新鮮に単離された細胞から、または培養された細胞もしくは細胞株から調製され得る。さらに、抽出物は、静止状態にあるかまたは活性化されたかのいずれかの細胞から調製され得る。細胞を活性化するために種々の薬剤が用いられ得る。活性化剤の選択は、用いられる細胞型に基づく。例えば、トロンビン、コラーゲン、またはADPは、血小板を活性化するために用いられ得、一方、PMAは、白血球を活性化するために用いられ得る。

一旦細胞の抽出物が調製されたら、抽出物は、Bapタンパク質またはBap/ $\beta$ 3複合体と、BapまたはBap/ $\beta$ 3複合体とシグナル伝達パートナーとの会合が生じ得る条件下で混合される。種々の条件が用いられ得、最も好ましくは、インテグリン発現細胞の細胞質で見出される条件に緊密に類似した条件である。容量オスモル濃度、pH、および用いられる細胞抽出物の濃度のような特徴が、インテグリンとシグナル伝達パートナーとの会合を最適化するために変更され得る。

適切な条件下で混合した後、BapまたはBap/ $\beta$ 3複合体が混合物から分離される。混合物を単離するために種々の技術が利用され得る。例えば、BapまたはBap/ $\beta$ 3複合体に特異的な抗体は、BapまたはBap/ $\beta$ 3複合体および会合したシグナル伝達パートナーを免疫沈降するために用いられる。あるいは、標準的な化学的分離技術（例えば、クロマトグラフィーおよび密度/沈降遠心分離）が用いられ得る。

抽出物中に見い出される、会合していない細胞成分を除去した後、シグナル伝達パートナーは、従来技術を用いてBapまたはBap/ $\beta$ 3複合体から解離され得る。例えば、解離は、混合物の塩濃度またはpHを変更することにより達成され得る。

混合された抽出物から会合したインテグリン/シグナル伝達パートナー対を分離するのを補助するために、BapまたはBap/ $\beta$ 3複合体は、固体支持体に固定化され得る。例えば、Bapは、ニトロセルロースマトリックスまたはアクリル酸ビーズに付着され得る。固体支持体へのBapの付着は、抽出物中に見出される他の成分からペプチド/シグナル伝達パートナーを分離するのを補助する。

同定されたシグナル伝達パートナーは、単一のタンパク質または2つ以上のタンパク質から構成される複合体のいずれかであり得る。

あるいは、Bapコード核酸分子は、酵母ツーハイブリッドシステムにおいて用いられ得る。酵母ツーハイブリッドシステムは、他のタンパク質パートナー対を同定するために用いられており、そして本明細書中に記載されるBapコード分子を用いるように容易に適応され得る（実施例2を参照のこと）。

H. Bapおよび他の単離されたシグナル伝達パートナーの使用

一旦単離されたら、上記の方法を用いて得られたインテグリンシグナル伝達パートナー、ならびに記載されるBapタンパク質（特に、Bap-1）は、種々の目的に

用いられ得る。これらのタンパク質は、当該分野で公知の技術を用いてBapタンパク質またはシグナル伝達パートナーに結合する抗体を生じさせるために用いられ得る。Bapまたは別のインテグリンシグナル伝達パートナーに結合する抗体は、インテグリンシグナル伝達をアッセイするためか、インテグリンシグナル伝達により媒介される生物学的または病理学的プロセスを調節するための治療剤としてか、またはシグナル伝達パートナーを精製するために用いられ得る。これらの使用は、以下に詳細に記載される。

I. インテグリン細胞質シグナル伝達パートナー相互作用をブロックする薬剤を同定するための方法

本発明の別の実施態様は、インテグリンと細胞質シグナル伝達複合体（例えば、Bapタンパク質またはBap/シグナル伝達パートナー複合体（本明細書中以下、Bapシグナル伝達複合体と集合的にいう））との会合を低減させるかまたはブロックする薬剤を同定するための方法を提供する。詳細には、 $\beta^3$ インテグリンは、Bapタンパク質、Bapを含有する細胞抽出物、またはBapの複合体および上記のシグナル伝達パートナーと、試験される薬剤の存在下および非存在下で混合される。インテグリンまたはペプチドと、Bapシグナル伝達複合体との会合を可能にする条件下での混合後、2つの混合物を分析および比較して、この薬剤が、インテグリンとBapシグナル伝達複合体との会合を低減させたかまたはブロックしたか否かを決定する。インテグリンとBapシグナル伝達複合体との会合を低減またはブ

ロックする薬剤は、試験薬剤を含有するサンプル中に存在する会合の量の減少として同定される。

別の形式では、Bap-1の転写リプレッサー活性をブロックするかまたは低減させる薬剤は、発現レベルが、Bap-1により抑制される遺伝子の転写調節エレメントと、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）のようなレポーター遺伝子との間の融合体を用いることにより同定され得る。このような融合体の例は、NF- $\kappa$ B-CAT、およびAP-1-CAT融合体を含む。この形式では、適切なレポーター融合体を発現する細胞は、トランスフェクトされてBap-1を、試験される薬剤の存在下および非存在下で発現する。試験される薬剤の存在下でレポーター

遺伝子の発現を抑制する能力が減少したBap-1を示す細胞株は、Bap-1リプレッサー活性を阻害し得る薬剤を同定する。レポーター遺伝子発現を検出するためのアッセイは、CATおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -gal）を含むがこれらに限定されない多数のレポーター遺伝子として広範に利用可能であり、そして市販されている。例えば、このようなアッセイは、GIBCO-BRLから市販されている。

本明細書中で用いられる、薬剤は、この薬剤の存在が、Bapシグナル伝達複合体が $\beta$ 3インテグリンと会合し始める程度を減少させるかまたはそれを防止する場合、インテグリン/Bapシグナル伝達複合体会合を低減させるかまたはブロックするといわれる。一方のクラスの薬剤は、Bapシグナル伝達複合体に結合することにより会合を低減させるかまたはブロックし、一方、別のクラスの薬剤は、 $\beta$ 3インテグリンに結合することにより会合を低減させるかまたはブロックする。

上記のアッセイにおいて用いられるBapシグナル伝達複合体は、単離され、そして完全に特徴づけられたタンパク質（例えば、Bap-1）であり得るか、または細胞抽出物中の存在すると同定されているBap-1もしくはBap-1/シグナル伝達パートナー複合体に結合する部分的に特徴付けられたタンパク質のいずれかであり得る。Bapシグナル伝達複合体が同定可能な特性（例えば、分子量）により特徴付けられている限り、本発明が用いられ得ることが当業者には明らかである。

上記の方法においてアッセイされる薬剤は、ランダムに選択または合理的に選択もしくはは設計され得る。本明細書中で用いられる、薬剤は、薬剤が、インテグ

リンとBapシグナル伝達複合体との会合に関与する特定の配列を考慮せずにランダムに選ばれる場合、ランダムに選択されるといわれる。ランダムに選択される薬剤の例は、化学ライブラリーもしくはペプチドコンビナトリアルライブラリー、または生物の増殖プロセスの使用である。

本明細書中に使用される、薬剤は、薬剤の作用と関連した標的部位の配列および／またはそのコンホメーションを考慮してランダムでない基礎に基づいて選ばれる場合、合理的に選択または設計されるといわれる。上記のように、インテグリン／Bapシグナル伝達複合体相互作用をブロックする薬剤に対する2つの作用部位が存在する： $\beta 3$ サブユニットの細胞質ドメインまたはBapシグナル伝達複合体。薬剤は、インテグリン／Bapシグナル伝達複合体対の接触部位を構成するペ

プチド配列を利用することにより合理的に選択されるかまたは合理的に設計され得る。例えば、合理的に選択されたペプチド薬剤は、そのアミノ酸配列が、インテグリン上のBap-1接触部位と、またはBap-1上の $\beta 3$ 接触部位と同一であるペプチドであり得る。このような薬剤は、それぞれ、Bap-1または $\beta 3$ に結合することにより、インテグリンとシグナル伝達パートナーとの会合を低減させるかまたはブロックする。

本発明の薬剤は、例としては、ペプチド、低分子、ビタミン誘導体、ならびに炭水化物であり得る。当業者は、本発明の薬剤の構造的な性質に制限が存在しないことを容易に認識し得る。

本発明の1つのクラスの薬剤は、アミノ酸配列が $\beta 3$ サブユニットの細胞質ドメインのアミノ酸配列、またはBapタンパク質（例えば、図1に記載されるヒトBap-1配列）のアミノ酸配列に基づいて選ばれるペプチド薬剤である。

本発明のペプチド薬剤は、当該分野で公知のように、標準的な固相（または液相）ペプチド合成法を用いて調製され得る。さらに、これらのペプチドをコードするDNAは、市販のオリゴヌクレオチド合成装置を用いて合成され得、そして標準的な組換え生成システムを用いて的に生成され得る。固相ペプチド合成を用いる生成は、遺伝子にコードされないアミノ酸が含まれる場合、必要である。

本発明の薬剤の別のクラスは、インテグリンの細胞質ドメインの重要な位置ま

たはBap-1のようなBapシグナル伝達複合体と免疫反応性のある抗体である。抗体薬剤は、抗体によって標的化されるように意図される、抗原領域として $\beta$ 3細胞質ドメインまたはBapシグナル複合体のそれらの部分を含むペプチドでの適切な哺乳動物被験体の免疫化によって得られる。重要な領域は、Bapシグナル伝達複合体とインテグリンの会合に関与する接触部位を含む。

抗体薬剤は、それが十分な長さである場合、ペプチドハプテン単独を、あるいは所望であれば、または免疫原性を増強する必要がある場合、適切なキャリアと共に結合体化されたペプチドを用いて、適切な免疫化プロトコルにおいて適切な哺乳動物宿主を免疫化することにより調製される。BSA、KLHまたは他のキャリアタンパク質のようなキャリアとの免疫原性結合体を調製する方法は、当該分野で周知である。いくつかの環境において、例えば、カルボジイミド試薬を用いる直

接結合体化が有効であり得；他の場合、Pierce Chemical Co.、Rockford、ILによって供給される連結試薬のような連結試薬は、ハプテンへの接近性を提供するのに所望され得る。ハプテンペプチドは、アミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで、Cys残基で延長され得るか、または例えばシステイン残基で散在させることによりキャリアへの連結を容易にし得る。免疫原の投与は、一般に、適切な時間にわたる注射によって、および一般に当該分野で理解されるように適切なアジュバントの使用により行われる。免疫化のスケジュールの間、抗体の力価を取り、抗体形成の適切さを決定する。

このように生成されたポリクローナル抗血清は、いくつかの適用、薬学的組成物を満足させ得るが、モノクローナル調製物の使用が好ましい。所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株は、KohlerおよびMilsteinの標準方法、または一般に公知のようにリンパ球または脾臓細胞の不死化をもたらす改変を用いて、調製され得る。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原がペプチドハプテンであるか、またはインテグリンもしくはシグナル伝達複合体自身であるかである、免疫アッセイによってスクリーニングされる。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定される場合、細胞は、インビトロまたは腹水における産生のいずれかにより培養され得る。

次いで、所望のモノクローナル抗体は、培養上清または腹水上清から回収される。免疫学的に有意な部分を含む、モノクローナルのフラグメントまたはポリクローナル抗血清は、アンタゴニストおよびインタクトな抗体として用いられ得る。免疫学的に反応性のフラグメント（例えば、Fab、Fab'）、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントの使用はしばしば、特に治療的狀況で好ましい。なぜなら、これらのフラグメントは、一般に、免疫グロブリン全体よりも免疫原性が弱いからである。

抗体またはフラグメントはまた、現在の技術である、組換え手段を用いて、産生され得る。レセプターの所望の領域に特異的に結合する領域はまた、複數種の起源とのキメラの条件で産生され得る。

このように、産生された抗体は、インテグリンのBapシグナル伝達複合体の会合のモジュレーターとしてだけではなく、インテグリン媒介性シグナル伝達の検出のためのアッセイにおいて、およびインテグリン会合シグナル伝達タンパク質

の精製のためにもまた、有用である。

#### J. Bapシグナル伝達複合体とのインテグリンの会合を阻害する薬剤の使用

背景技術の章で提供したように、インテグリンは、細胞内シグナル伝達、細胞付着、細胞凝集、および細胞移動において重要な役割を果たす。インテグリンのBapシグナル伝達複合体との相互作用を減少させるかまたは阻害する薬剤を使用して、インテグリン機能および活性に関連する生物学的プロセスおよび病理学的プロセスを調節し得る。

詳細には、インテグリンによって媒介される生物学的プロセスおよび病理学的プロセスは、インテグリンのBapシグナル伝達複合体との相互作用を阻害する薬剤を被験体に投与することによって調節され得る。

本明細書中で使用される場合、被験体は、インテグリンによって媒介される病理学的プロセスまたは生物学的プロセスの調節を必要とする動物である限り、任意の動物であり得る。用語「哺乳動物」とは、哺乳綱に属する個体を意味する。本発明は、ヒト被験体の処置に特に有用である。

本明細書中で使用される場合、インテグリンまたはインテグリンシグナル伝達によって媒介される生物学的プロセスまたは病理学的プロセスとは、インテグリン

ンがBapタンパク質またはBapシグナル伝達複合体を含む細胞内シグナルを産生する基質に結合する広範な種々の細胞事象をいう。生物学的プロセスの例は、基質および他の細胞への細胞付着または接着、細胞凝集、細胞移動、細胞増殖および細胞分化を含むが、これらに限定されない。

病理学的プロセスとは、悪影響を生じる生物学的プロセスのカテゴリーをいう。例えば、血栓症は、血小板の有害な付着および凝集である一方、転移は、腫瘍細胞の有害な移動および増殖である。これらの病理学的プロセスは、インテグリン/Bapシグナル伝達複合体結合を低減させるかまたはブロックする薬剤を用いて調節され得る。

本明細書中で用いられる場合、薬剤とは、薬剤がプロセスの程度および重篤性を低減する場合に、病理学的プロセスを調節するといわれる。例えば、薬剤は、薬剤が血小板の付着または凝集を低減する場合に、血栓症を調節するといわれる。

$\beta 3$ サブユニットの2つの公知の対合は、観察されている： $\alpha V$ との対合によりビトロネクチンレセプターである $\alpha V \beta 3$ ；およびGPIIbとの対合によりフィブリノーゲンレセプターであるGPIIb-IIIa。 $\alpha V \beta 3$ は広範に分布しており、インテグリンのファミリーの最も乱雑なメンバーであり、そして広範囲の接着性タンパク質への細胞性付着を、ほとんどの場合接着性タンパク質のRGD配列で、媒介する。 $\alpha V \beta 3$ により媒介される生物学的プロセスは多様であり、そして骨再吸収、血管新生、腫瘍転移、および再狭窄を含む。 $\alpha V \beta 3$ は、接着性タンパク質結合の際にシグナル伝達することが知られている (P.I. Levesleyら, J. Cell. Biol., 121: 163-170, 1993)。例えば、内皮細胞は、結合から解除される場合、アポトーシスを受ける (P.C. Brooks, Cell 79: 1157-1164, 1994)。

対照的に、GP IIb-IIIaは血小板および巨核球系統の細胞に限定されるが、GP IIb-IIIaが腫瘍細胞系統に存在することを示唆する報告も出現している。本願の他の場所で詳細に考証したように、GP IIb-IIIaの機能は、主に、血小板凝集を媒介する接着性タンパク質に結合することである。この機能において、GP IIb-IIIaは、内側から外側、および外側から内側へのシグナル伝達の両方に関与する



。GP IIb-IIIaのレセプター機能の低減は、出血をもたらし；GP IIb-IIIaのレセプター機能の上昇は、血栓形成をもたらし得る。GP IIb-IIIaを介する血小板凝集が腫瘍転移にもまた関与し得るという研究も出現している。

#### K. インテグリンシグナル伝達に影響する薬剤の投与

本発明の薬剤は、単独または特定の病理学的プロセスを調節する別の薬剤とともに提供され得る。例えば、インテグリン媒介性細胞シグナル伝達をブロックすることにより血栓を低減させる本発明の薬剤は、他の抗血栓薬剤と共に投与され得る。本明細書で使用されるように、2つの薬剤は、その薬剤が同時に作用するような様式で2つの薬剤が同時に投与されるかまたは独立に投与される場合、組み合わせられて投与されるという。

本発明の薬剤は、非経口的、皮下的、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮的、または口内経路を介して投与され得る。あるいは、または同時に、投与は、経口経路を介し得る。投与される投薬量は、年齢、健康、およびレシピエントの体重、同

時処置の種類（存在する場合）、処置の頻度、および所望の効果の性質に依存する。

本発明はさらに、インテグリン/シグナル伝達複合体結合をブロックする1つ以上の薬剤を含有する組成物を提供する。個体の必要性は種々であるが、各成分の有効量の最適範囲の決定は、当業者の技術範囲内である。代表的な投薬量は、0.1~100Tg/kg体重を含む。好ましい投薬量は、0.1~10Tg/kg体重を含む。最も好ましい投薬量は、0.1~1 Tg/kg体重を含む。

薬学的に活性な薬剤に加えて、本発明の組成物は、賦形剤および作用部位への送達のために薬学的に使用され得る調製物への活性化化合物の加工を容易にする補助剤を含む適切な薬学的に受容可能なキャリアを含む得る。非経口投与のための適切な処方物は、活性化化合物の水溶性形態での水性溶液（例えば、水溶性塩）を含む。さらに、適切な油状の注射懸濁液としての活性化化合物の懸濁液は投与され得る。適切な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油（例えば、ゴマ油）または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド）を含む。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘性を増大させる物質（例えば、カルボキシメチル

セルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストラン)を含み得る。必要に応じて、懸濁液はまた、安定剤を含み得る。リポソームもまた、細胞への送達のために薬剤をカプセル化するために使用され得る。

本発明の全身性投与のための薬学的処方物は、経腸投与、非経口投与、または局所投与について処方され得る。実際、これら全ての型の処方物は、活性成分の全身性投与を達成するために同時に使用され得る。

経口投与に適した処方物は、硬ゼラチンカプセルまたは軟ゼラチンカプセル、丸剤、錠剤(コーティング錠剤を含む)、エリキシル、懸濁液、シロップ、または吸入、およびそれらの制御放出形態を含む。

本発明の方法を実施する際に、本発明の化合物は、単独でか、または他の治療剤または診断剤とともに使用され得る。特定の好ましい実施態様において、本発明の化合物は、代表的にこれらの条件に対して一般に受容された医療行為に従って処方された他の化合物(例えば、抗凝固剤、血栓溶解剤、または他の抗血栓剤(血小板凝固インヒビター、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナー

ゼ、プロキナーゼ、ストレプとキナーゼ、ヘパリン、アスピリン、またはワルファリンを含む))と同時に投与され得る。本発明の化合物は、通常は、インビボで哺乳動物(例えば、ヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、およびマウス)で、またはインビトロで利用され得る。

#### L. インテグリン媒介性シグナル伝達を同定する方法

本発明はさらに、インテグリン媒介性シグナル伝達に関連する細胞を同定する方法ならびにインテグリン媒介性シグナル伝達に関連する生物学のプロセスおよび病理学的プロセスの診断に適用され得る技術を提供する。具体的には、インテグリン媒介性シグナル伝達は、Bapタンパク質、またはBapシグナル伝達複合体が発現するか、および／または $\beta^3$ インテグリンに会合するかを決定することによって同定され得る。BapまたはBapシグナル伝達複合体が発現するか、または中でBapまたはBapシグナル伝達複合体が $\beta^3$ インテグリンと会合している細胞は、インテグリン媒介性シグナル伝達に関与するとみなされる。このような方法は、炎症、血栓、血管新生、および腫瘍転移の部位を同定するのに有用である、

1つの例では、 $\beta 3$ インテグリンを含む細胞の抽出物が調製される。次いで、抽出物は、 $\beta 3$ インテグリンがBapまたはBapシグナル伝達複合体と会合するかどうかを決定するためにアッセイされる。存在する会合の程度は、細胞が関与するシグナル伝達の程度の尺度を提供する。シグナル伝達の程度の増大は、インテグリン媒介活性のレベルの尺度である。

例えば、腫瘍が転移能力を有するかどうかを決定するために、腫瘍細胞からの抽出物を作製し、そして免疫沈降のような公知の方法を使用して腫瘍細胞によって発現された $\beta 3$ インテグリンを単離する。次いで、インテグリンを、例えばゲル電気泳動によって分析し、Bapタンパク質がインテグリンに会合するかどうかを決定する。Bap会合の存在およびレベルは、ガンの転移能力に相関する。

あるいは、Bapタンパク質またはBap遺伝子発現のレベルを、インテグリン媒介シグナル伝達における細胞の関与と直接相関させるために使用し得る。種々の免疫学および核酸の技術を使用して、Bapタンパク質、またはBapをコードするmRNAが特定の細胞において産生されるかどうかを決定し得る。Bapタンパク質またはB

apをコードするmRNAのレベルの増大の存在が、ガンの転移能力に相関する。

#### M. 遺伝子治療

Bap遺伝子およびBapタンパク質はまた、種々の状況において遺伝子治療の標的として作用し得る。例えば、1つの適用において、Bap欠損非ヒト動物は、標準的なノックアウト手順を使用して、Bap遺伝子を不活化するために生成され得る。このような使用において、遺伝子のBapファミリーのメンバーが不活化されている非ヒト哺乳動物（例えば、マウスまたはラット）が生成される。これは、標的化組換えのような種々の当該分野で公知の手順を使用して達成され得る。一旦生成されると、Bap欠損動物は、1) Bapによって媒介される生物学および病理学的プロセスを同定するため、2) Bapと相互作用するタンパク質および他の遺伝子を同定するため、3) Bap欠損を克服するために外因的に供給され得る物質を同定するため、および4) 活性を増大または減少させるBapの変異を同定するための適切なスクリーニングとして働かせるために、使用され得る。

動物モデルに加えて、ヒトBap欠損は、被験体において欠損であるBapタンパク

質をコードする遺伝子構築物を、ヒトに供給することによって補正され得る。種々の技術が、現在利用可能であり、他は、遺伝子欠損を補正するために核酸分子をヒト被験体に導入するために開発中である。このような方法は、本発明のBapコード核酸分子を利用するために容易に適合され得る。

別の実施態様において、遺伝子治療は、Bap媒介性生物学的または病理学的プロセスを調節するための手段として使用され得る。例えば、移植片拒絶の最中に、処置される被験体に、Bap-1/インテグリン媒介性シグナル伝達のモジュレーターをコードする遺伝子発現ユニット（例えば、アンチセンスをコードする核酸分子）を導入することが望ましくあり得る。このようなモジュレーターは、構成的に産生され得るか、または細胞もしくは特定の標的細胞内で誘導し得るかのいずれかであり得る。このことは、被験体内での治療剤の連続的なまたは誘導性の供給を可能にする。

実施例に示すように、Bap-1は、NF- $\kappa$ BおよびAP-1によって調節される遺伝子を含む遺伝子を標的化する転写リプレッサーであるようである。AP-1およびNF- $\kappa$ B

の両方が、多くの型の疾患（例えば、ガン）に関与しているので、Bap-1遺伝子自体は、遺伝子アップレギュレーションに関する疾患の処置のための治療剤として作用し得る。

さらに記載することなく、当業者は、前述の記載および以下の例示的な実施例を使用して、本発明の化合物を作製および利用し、そして請求の範囲に記載される方法を実施し得ると考えられる。それゆえ、以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を具体的に指摘し、そして開示のそれ以外の部分をいかなる様式によっても限定すると解釈されるべきではない。

他の一般的構成は、当業者に明らかである。

### 実施例

#### 実施例 1

##### Bap-1のクローニング

酵母ツーハイブリッド系（Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582, 1991）を使用して、 $\beta$  3インテグリンサブユニットの細胞質テールと特異的

に相互作用するタンパク質を同定した。2つの異なる GAL4-依存性レポーター遺伝子、HIS3およびlacZを利用するヒスチジン選択系(Durfeeら, Gene Dev. 7:555-569, 1993)を使用した。おとり (bait) は、ベクターpGBT9のGAL4 DNA結合ドメインに融合した $\beta$ 3細胞質ドメインであった。新たな構築物を、pGBT9-IIIaと命名した。融合産物として発現されるマウス胚cDNAライブラリーの約 $5 \times 10^6$ の一次形質転換体(Vojtekら, Cell. 74:205-214, 1993)をスクリーニングした。数百のクローンは、有意なヒスチジン栄養性(prototrophy)を示し、そしてこれらのうちの20は、強く $\beta$ -ガラクトシダーゼポジティブであった。これらのクローンうちの2つ(126-2および141-1)については、ヒスチジン栄養性および $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、両方のプラスミドの存在に依存した。さらなるコントロールとして、cDNAライブラリープラスミドのみを含有する分離個体を、GAL4 DNA結合タンパク質(pGBT9)のみ、およびいくつかのテスターGAL4 DNA結合タンパク質融合物(vRafおよび変異体v-Rafを含む)を発現する細胞と接合させた(Liら, EMBO 14:685-696, 1995)。ヒスチジン栄養性および $\beta$ -ガラクトシダー

ゼ活性は、元のpGBT9-IIIaとの組み合わせでのみで回復された。

126-2および141-1のcDNAライブラリープラスミドDNAを、E.coliに形質転換し、そしてDNA配列決定に供した。配列データは、これらの2つのクローンのインサートが、単一の遺伝子に由来し、そしてGenBankデータベースの検索により、この遺伝子がデータベースに表れないことが明らかになった。DNA配列決定は、いずれのcDNAクローンも、完全なタンパク質コード領域を含まないことを示した。

126-2ヒトホモログの完全長cDNAをクローニングするために、ヒト骨髄5 $\alpha$ ストレッチ+ (プラス) 1gt11 cDNAライブラリー (Clontech, CAT HL5005b) を、プロンプトとしてクローン126-2から単離された400bpのNotIフラグメントを使用してスクリーニングした。約 $5 \times 10^6$ 個のクローンをスクリーニングし、2つのポジティブクローンgt5およびgt6を同定した。標準的な技術を使用して2つのクローンを増幅した。DNAを調製し、そしてインサートをpBSKSIIにサブクローニングし、NotI部位で切断した。gt5由来のNotIフラグメントを含むクローンを、pBSgt5と

命名し、そしてファージgt6由来のNotIインサートを含むクローンを、pBSgt6と命名した。制限マッピングおよび予備配列決定は、pBSgt6が3.5kbpのインサートを有し、そしてpBSgt5が、pBSgt6内に含まれる2.1kbpのインサートを有することを示した。pBSgt6のcDNAインサートを、配列決定分析に供し、そしてオープンリーディングフレームを含む3.5kbpのサイズを有することが示された。

## 実施例2

### 酵母ツーハイブリッド系においてBap-1は

#### $\alpha$ IIbおよびv-Srcキナーゼと相互作用する。

インテグリンファミリーのタンパク質または変異体、およびいくつかの潜在的なシグナル伝達分子のスペクトルを、酵母ツーハイブリッド系においてBap-1と相互作用するその能力について試験した。Bap-1は、 $\alpha$  IIbおよびv-Srcチロシンキナーゼの細胞質テールと相互作用するが、 $\beta$  2、 $\beta$  3(S752P)セリンプロリン変異体の細胞質テールまたは $\beta$  3/ $\beta$  1キメラとは相互作用しないことが示された。さらに、Bap-1が、ツーハイブリッドにおいてBap-1と相互作用することが観察された。これは、機能的ホモダイマーが、細胞内で形成され得ることを示唆する。

結果は、Bap-1が、インテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3シグナル伝達を、他の公知のシグナル伝達分子（例えば、pp60srcキナーゼ）を架橋することによって連結し得ることを示す。主要な血小板チロシンキナーゼであるSrcキナーゼは、異なるアゴニストによる血小板活性化の間の細胞のタンパク質のチロシン特異的リン酸化に関与することが予想される。Srcキナーゼは、 $\beta$  3インテグリンをインビトロでリン酸化することが示された(Lawら、J. Biol. Chem. 271:10811-10815, 1996)。総血小板pp60srcの40%は、血小板活性化の際に細胞骨格画分と会合する(Horvathら、EMBO J. 11:855-861, 1992)。血小板のトロンビン刺激は、pp60c-srcの比活性の一過性の増大、その後のpp60csrcのtriton X-100不溶性の細胞骨格豊富画分への再分配を誘導する(Clarkら、Molec. Cell Biol. 13:1863-1871, 1993)。この会合は、血小板凝集およびアクチンポリマー化を必要とする(Odaら、J. Biol. Chem. 267:20075-20081, 1992)。本発明の知見は、インテグリンをタンパク質チ

ロシキンナーゼと架橋することによって、外側から内側、および内側から外側のシグナル伝達の両方に関与するとしてBap-1を関係づける。

### 実施例 3

#### マウスBap-1の分析

Bap-1は、RINGフィンガードメインを有する336アミノ酸のタンパク質をコードする。Bap-1のタンパク質配列の分析により、CX2CX11ECLHXFCX2CX11CX2と記載され得る独特なアミノ末端RINGフィンガーモチーフを同定する。発達（例えば、DG17 (DriscollおよびWilliams, MCB 7:4482-4489, 1987) およびPosterior Sex Combおよびzesteのサブレッサー2 (Brunkら, Nature 353:351-353, 1991; Lohuizenら, Nature 353:353-355, 1991)、遺伝子転写（例えば、RPT-1 (Patarcaら, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2733-2737, 1988)、DNA修復（例えば、RAD-18 (Jonesら, Nucleic Acids Res. 16:7119-7131, 1988)、発癌遺伝子形質転換（例えば、BMI-1 (Hauptら, Cell 65:753-763, 1991)、腫瘍抑制（例えば、BRCA-1 (Mikiら, Science 266:66-71, 1994)）、およびシグナル伝達（例えば、CD40-結合タンパク質 (CD40-bp) (Huら, J. Biol. Chem. 269:30069-30072, 1994) およびTRAF2 (Rotheら, Cell 78:681-692, 1994; Hsuら, Cell 84:299-308,

1996) ) の間に関係するとされるRINGドメインを共有するタンパク質が報告されている。急性の前骨髄球白血病プロ発癌遺伝子PML由来のRINGフィンガードメインの溶液構造は、PML RINGフィンガーが、タンパク質-タンパク質相互作用 (Bordenら, 1995, EMBO J. 14:1532-1541) (タンパク質複合体にシグナル伝達するのに一般に使用される分子機構) の生成に関与することを示唆した。

Bap-1は、ring1遺伝子との有意な配列類似性（すなわち、アミノ酸レベルでのRING1遺伝子との48%同一性を有する）を有し、その機能は未知である。興味深いことに、Bap-1は、発癌遺伝子bmi-1に比べ、元々B細胞およびT細胞リンパ腫に関与することが見出された）に相同であると考えられているDrosophila遺伝子であるPosterior Sex Comb (Psc) と17%の同一性を共有する。Pscは、Polycombグループ遺伝子ファミリーのメンバーであり、これは、Drosophilaゲノムの同一性を調節する相同異質形成の遺伝子の抑制を維持することが要求される。bm

i-1は、脊椎動物において類似の役割を演じるようであった。bmi-1ノックアウトマウスは、軸骨格の後方形質転換 (van der Lugtら, *Gene & Dev.* 8:757-769, 1994) を示す; およびマウスにおけるbmi-1の過剰発現は、反対の表現型、脊椎動物同一性の用量依存性前方形質転換 (Aldemaら, *Nature* 374:724-727, 1995) を示す。Pscおよびbmi-1の両方は、細胞中に一過的に導入された場合に、アクチベーター機能を抑制し得る (BunkerおよびKingston, *Molec. Cell Biol.* 14:1721-1732, 1994)。さらに、RINGフィンガーモチーフを含むアミノ酸配列を共有する別のPolycombグループ関連哺乳動物遺伝子、me1-18は、腫瘍抑制活性を有する転写ネガティブレギュレーターとして機能し得る。

この全てが、Bap-1タンパク質が、インテグリンの役割が関係付けられる細胞移動、細胞増殖、および発達において重要な役割を演じ得ることを示唆する。例えば、Bap-1タンパク質は、潜在的な転写レギュレーターとして、ポジティブかまたはネガティブのいずれかで機能し得、これは、インテグリンの $\beta^3$ 細胞質テールに結合している場合には不活性であるが、外側から内側、または中側から外側のシグナル伝達によって活性化され得、次いでテールから解離し、そして核の中へ移動する。

#### 実施例 4

##### Bap-1は転写リプレッサー活性を示す

Ap-1およびNF- $\kappa$ B依存性プロモーターの転写制御に対するBap-1発現の効果を決定するために、フラグタグ化した全長bap-1ならびにbap-1の欠失変異体を、Ap-1およびNF- $\kappa$ B依存性転写制御エレメントへのCAT融合物を含有するNIH3T3細胞にトランスフェクトした。Bruderら, (1992) *Genes & Dev.*, 6:545-556, およびBaldwinら, (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4943-4951。コードされたアミノ酸を含むbap-1の欠失変異体を図3に記載する。

図4は、NIH3T3細胞におけるNF- $\kappa$ B-CATリポーター融合物の発現に対するbap-1の全長および欠失変異体の発現の効果を要約する。NIH3T3細胞を、100mMで、10%ウシ血清を有するDMEM中で70%コンフルエントまで増殖させ、そして製造者の指示に従って、LipofectAMINE (GIBCO-BRL) を用いて、プラスミドDNAでトラ



ンスフェクトした(各 $10 \mu\text{g}/\text{皿}$ のpCIneoBap-1またはその欠失変異体、 $4 \mu\text{g}/\text{皿}$ のレポータープラスミドのpMHC-NF- $\kappa$ B-CATまたはpB4Xを伴う)。トランスフェクション24時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、0.25%ウシ血清を有するDMEMを添加し、そしてさらに12時間インキュベートした。次いで、細胞をトリプシン処理し、そして0.25%ウシ血清を含有するDMEM中に再懸濁し、そして0.7%アガロースの上に重層した。このように細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃で6時間インキュベーションした後、細胞の半分を、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビトロネクチンで被覆した皿に移し(接着のため)、そして細胞のもう半分を0.7%寒天中に残した(懸濁のため)。90分後、細胞を採集し、そしてCAT ELISAアッセイを供給元(Boehringer Mannheim, カタログ番号1363727)の指示に従って行った。全長Bap-1の発現は、NF- $\kappa$ B-CAT融合物の発現のわずかな減少を生じる。Bap-1からのRINGドメインの欠失により、見かけ上、Bap-1がNF- $\kappa$ B-CAT融合物の転写抑制を示すことができなくなる。Bap-1のC末端の欠失は、NF- $\kappa$ B-CAT融合物の強い転写抑制を生じる。これらの結果は、Bap-1 RINGドメインが、抑制活性に関与し、そしてタンパク質のC末端側半分が、リプレッサー活性の負の調節に関与していることを示唆する。

図5は、NIH3T3細胞におけるAP-1-CATリポーター融合物の発現に対するbap-1

の全長および欠失変異体の発現の効果を要約する。細胞培養およびトランスフェクションを上記のように行った。全長Bap-1の発現は、AP-1-CAT融合物の発現のわずかな減少を生じる。Bap-1からのRINGドメインの欠失は、AP-1-CAT融合物の転写抑制を示すBap-1の能力の見かけ上の減少を生じる。Bap-1のC末端の欠失は、AP-1-CAT融合物の強い転写抑制を生じる。これらの結果は、全長Bap-1がAP-1リポーター活性の阻害に関与することを示唆する。野生型Bap-1は、NF- $\kappa$ Bの調節の際に有効ではないようなので、このことは、野生型Bap-1が特定の遺伝子を持異的に調節し得ることを示唆する。RING欠失は、損なわれるがリプレッサー活性を示すので、このことは、タンパク質において、リプレッサー活性に関与する第二の領域が存在することを示唆する。NF- $\kappa$ Bリポーターを用いて得られたデータと一致して、タンパク質のC末端側半分は、リプレッサー活性の調節に関与し

ている。タンパク質のC末端側半分の欠失は、タンパク質を構成的に活性とする。

### 実施例 5

#### Bap-1の組織分布

Bap-1発現の組織分布をノーザンブロットにより調べ、そしてBap-1がほとんどの組織において発現されることを見出した。これは、Bap-1が、細胞機能において重要な役割を有するという示唆と一致する。3.6kb mRNAに加えて、本発明者らは、ほとんどの組織において2.4kbサイズのmRNAを検出した。これは、Bap-1のスパライズ型、またはBap関連遺伝子であり得る。

クローン126-2 (Bap-1のマウスホモログの部分cDNA) はBap-1の中央部に位置し、そしてBap-1と98%同一である。また、高度の保存は、細胞調節におけるBap-1のための基本的な役割を示唆している。

酵母ツーハイブリッドで観察されたBap-1と細胞質尾部との間の相互作用は、酵母タンパク質により媒介されないようである。このことは、精製 $\alpha$  II $\beta$  3および精製Bap-1タンパク質を用いるインビトロ結合アッセイにより、さらに示された。詳細には、Bap-1を、E. coliにおいてGST-Bap-1融合タンパク質として発現させ、そして精製し、そしてグルタチオンアガロースビーズ上に固定化した。次いで、固定化GST-Bap-1融合物を精製 $\alpha$  II $\beta$  3とインキュベートし、そしてビー

ズにおける保持をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットティングにより分析した。結果は、 $\beta$  3タンパク質がGST-Bap-1に特異的に結合するが、GSTコントロールには結合しないことを示した。インビトロでBap-1と $\beta$  3細胞質尾部との結合を確認できたことは、酵母ツーハイブリッド系において観察された強い相互作用と一致する。

### 実施例 6

#### 異種系におけるBap-1の発現

$\alpha$  II $\beta$  3を発現するCHO細胞は、血小板中と同様に、PAC-1結合により測定されるように、リガンド結合親和性の高度に調節された変化を表現する。CHO細胞異種系は、 $\alpha$  II $\beta$  3親和性を調節する役割における組換え遺伝子機能の分析を容

易にした。このタイプの分析の一例は、 $\alpha$  IIB  $\beta$  3 を発現する CHO 細胞が組換え R-Ras により活性化されることを示したことである。(Zhangら、Cell 85:61-69, 1996)。 $\alpha$  IIB  $\beta$  3 の調節に対する Bap-1 の効果を見るために、 $\alpha$  IIB  $\beta$  3 を、Bap-1 タンパク質、および Bap-1 の欠失改変体と同時発現させ、そして細胞表現型を適宜に調べた。

2 つの異なる戦略が内因性 Bap-1 活性／産生を減少させるために用いられ得る：すなわち、アンチセンス Bap-1 分子の使用または Bap-1 の阻害変異体の使用。TRAF2 および PML タンパク質における RING ドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用に関与するとして示されている。TRAF2 の場合、RING 欠失変異体は、TNF 媒介 NF- $\kappa$ B 活性化の優性ネガティブインヒビターとして機能する (Cell 84:299-308)。従って、RING 欠失は、Bap-1 RING ドメインと会合する分子の性質に依存して、Bap-1 をブロックまたは活性化し得る。このために、Bap-1 およびそれらの改変体を Flag タグ化し、そして哺乳動物発現ベクター中に挿入した。野生型 Bap-1、Bap-1 改変体 (例えば、RING 欠失変異体 Bap-1)、Bap-1 アンチセンス RNA、およびベクターコントロールを発現する安定な細胞株を、標準的な形質転換方法を用いて生成し得る。Bap-1 の発現を、抗 Flag および抗 Bap-1 抗体により決定し得る。次いで、細胞株を、 $\alpha$  IIB  $\beta$  3 の活性化 (PAC-1 結合)、細胞の広がり、およびフィブリノーゲンに対する付着に対する効果について調べ得る。Bap-1 のようなシグ

ナル伝達分子の過剰発現は、調節経路を脱感作し得る。従って、一過性および／または条件的発現もまた、Bap-1 遺伝子の機能を特徴づけるために開発され得る。

#### 実施例 7

##### 黒色腫における $\alpha$ V $\beta$ 3 機能に対する Bap-1 の効果

Bap-1 の発現が  $\alpha$  IIB  $\beta$  3 発現細胞 (例えば、血小板) に制限されないで、Bap-1 は、 $\alpha$  V  $\beta$  3 機能にも関与すると考えられる。このために、Bap-1 およびその改変体を、 $\alpha$  V  $\beta$  3 発現細胞株 (例えば、M21 黒色腫) にトランスフェクトし得る。また、接着特性 (例えば、ビトロネクチンにおける付着および広がり) を調べ得る。M21 黒色腫における  $\alpha$  V  $\beta$  3 の発現は、転移に必須である。

実施例 8Bap-1の細胞局在

Bapの細胞局在をインサイチュ免疫組織化学により調べ得る。抗Bap-1モノクローナル抗体、特に、1) E. coliにおいて発現および精製されたGST-Bap-1融合タンパク質、2) Bap-1タンパク質の独特の領域に対応する26マーのN末端ペプチド、および/または3) タンパク質の中央部に対応する26マーペプチドに対して生成される抗体は、容易に生成され得、そしてBap-1産生/発現の免疫組織化学試験において使用し得る。Bap-1の組織分布は、これらのBap-1抗体を用いて調べられ得る。

実施例 9インビボでのBap-1/ $\beta$ 3相互作用

上記のおよびインビトロでの酵母ツーハイブリッド系において観察された相互作用を確認するために、抗Bap-1抗体を、Bap-1を免疫沈降させるために用い得、そしてSDS-PAGEを、さらなる精製のために用い得る。次いで、 $\beta$ 3の存在もまた、抗 $\beta$ 3抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出し得る。逆実験もまた、 $\beta$ 3を免疫沈降させ、および抗Flagまたは抗Bap-1抗体を用いるブロッティングにより実施し得る。

実施例 10

タンパク質-タンパク質相互作用に必須であるドメインおよびアミノ酸の同定  
 $\beta$ 3尾部およびBap-1タンパク質の両方における必須残基を、欠失および変異誘発分析によってさらに同定し得る。一つの適用では、これらの実験を上記の酵母ツーハイブリッド系を用いて異種細胞で行う。

実施例 11PCRまたはライブラリースクリーニングによるBap-1関連遺伝子のクローン化

3.5kbのBap-1のmRNAに加えて、2.4kbのサイズのメッセンジャーRNAを、ヒトBap-1 cDNAまたはマウス部分cDNAをプローブとして使用してノーザンブロットにより調べたほとんどの組織において観察した。これらの結果は、Bap-1関連遺伝子または発現されるスプライス型が存在することを示唆した。Bap-1関連遺伝子を

、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリーをスクリーニングするためのBap-1cDNAをプローブとして使用して容易に単離し得るか、またはBap-1 DNA配列に基づいてプライマーを設計するために使用し得る。次いで、単離された遺伝子を、本願に列挙した他の実施例で詳述したように、インテグリンシグナル伝達におけるそれらの機能について調べ得る。

Bap-1遺伝子のゲノム研究：ヒト染色体Bap-1遺伝子を従来のアプローチにより単離し得、そしてそのゲノム構造および染色体位置を決定し得る。その染色体位置が任意の疾患遺伝子座に対応するかどうかを決定するために、ゲノムデータベースを検索し得る。

### 実施例 1 2

#### Bap-1の腫瘍形成または腫瘍サプレッサー活性

腫瘍形成形質転換は、しばしば、インテグリンシグナル伝達の脱調節（例えば、細胞接着の増大または減少）により達成される。Bap-1は、プロトオンコジーンBmi-1および腫瘍サプレッサー遺伝子Me1-18に対するアミノ酸類似性を有することに留意すると興味深い。従って、Bap-1の腫瘍形成または腫瘍サプレッサー活性

が試験され得る。簡単には、Bap-1およびその改変体をRat-1またはNIH3T3細胞にトランスフェクトし、そして軟寒天増殖および病巣形成を評価付けする。この両方とも、腫瘍形成活性の指標である。Bap-1の腫瘍サプレッサー活性を試験するために、Bap-1およびその改変体を一連の既知のオンコジーンと、Rat-1またはNIH3T3細胞に同時トランスフェクトし、そして既知のオンコジーンの腫瘍形成形質転換に対するBap-1の効果を調べる。

腫瘍転移は、血管形成を必要とし、そしてインテグリン $\alpha V\beta 3$ は血管形成に必須である。 $\alpha V\beta 3$ シグナル伝達を例えば、Bap-1/ $\beta 3$ 相互作用を調節することによりブロックすることにより、腫瘍転移を阻害し得る。

### 実施例 1 3

#### Bap-1同型接合欠損マウスの生成

日常的な遺伝的手順を用いて、Bap-1が不活化されたマウスの遺伝的ノックア

ウト変異体を作成し得る。好ましい方法は、標的化相同組換えを用いて、各リーディングフレームに複数の終止コドンを含む核酸分子を導入することである。これは、Bap-1遺伝子座を不活化するために供される。このようなマウスを用いて、Bap-1の生化学的および生理学的効果をさらに研究し得る。

本発明を、上記の実施例を参照して詳細に記載したが、本発明の思想から逸脱することなく、種々の改変がなされ得ることが理解される。従って、本発明は、以下の請求項によってのみ制限される。本出願において言及された引用特許および刊行物のすべては、その全体が参考として本明細書に援用される。

【図1】

GCCCTCGCTCGCTCGCTCCTTCCC GCCCTCCC CGCAGCGCCGGCCGAGCCGG  
 CTTCCCCTCAGTCTCTCATGAATATTGAGCGGCCCTGTTGTATTCCC GAGCT  
 CCATTGGCGAAGCTGAGGCTCGCCATATTGTGCGGCGCGCCGCGCTCGCGG  
 GCAGCTGATACCAGAGTCTTGTCTCCGGCCCGCGCCAGCGGAGCCCTGGGCTG  
 GGGCAGGAGCCGCAATGTCTCAGGCTGTGCAGACAAACGGAATCAACCAT  
 AAGCAAAACATGGGAATCAGTTTATATGAGTTACAACGAACCTCAGGAG  
 GCAATAACAGATGGCTTAGAAATTTGGTTTCACCTCGAAGTCTACACAGTG  
 AATTAATGTGCCCAATTTGTTGGATATGTTGAAGAACACCATGACATCAAAAG  
 GAGTGTTTACATCGTTTTTGTGCAGACTGCATCATCAGCCCTTAGAAGTGG  
 CAACAAAGAAATGTCCTACCTGTCCGAAAAAATAGTTTCCAAAAGATCACTA  
 AGGCCAGACCCAAACTTTGATGCATCTCAGCAAAATTTATCCAAGTCTGTG  
 ATGAGTATGAAGCTCATCAAGAGAGAGATTAGCCAGGATCAACAAGCACA  
 TAATCAGCAAGCACTCAGTCACAGCATTGAGGAAGACTGAAGATACAGGCC  
 ATGAACAGACTGCAGCGAGGCAAGAAAACACAGATTGAAATGGTAGTGGG  
 GCAGAAATATATGGTACAGTTTCACTGCAGTAATGCATCCACACATAGCA  
 ATCAGGAAGCAGGCCCTAGTAACAAACGGACCAAAACATCTGATGATCTGG  
 GCTAGAGCTTGATAATAACAATGCAGCAATGGCAATTGATCCAGTAATGGAT  
 GGTGCTAGTGAAATTTGAATTAGTATTTCAGGCCTCATCCCACCTTATGGAAA  
 AAGATGACAGTGCACAGACGAGATACATAAAGACTTCTGGTAACGCCACTGT  
 TGATCACTTATCCAAGTATCTGGCTGTGAGGTTAGCTTTAGAAGAACTTCGAA  
 GCAAGGTGAATCAAACAGATGAACCTTGATACAGCCAGTGAGAAGCAGT  
 ATACCATTATATAGCAACAGCCAGTGGCCAGTTCACTGTATTAAATGGCTCT  
 TTTTCTTTGGAATTTGGTCAGTGAGAAATCTGGAAGTGAACAAACCCATGG  
 AACTTTATTACGCACCTACAAAGGAGCACAATGAGCCTTTAAAAACCAAT  
 CTGAGACTGAACTTTTTTATAGCCTATTCTTTAAATATAAAGATGACTGGC  
 ATTACTTTTATGGAGATCTTGGATATGTTGTTCAATTTTCTTTCTGAGCCAGAC  
 TAGTTTACGCTATTCAAATCTTTCCCTTTATTIAAGATTTCTTTTGGGAAG  
 GGACTGCAATTATTCAGTATTTTTTTCTTTCTTTAAAAAATATATCTGAAGT  
 TTCTTGTTGTTTTTTTTTCCCCACAAAGTGTTTCCACTTGGAGCACCATT  
 TGACCCAGGAATTTTTCATAGTTTCTGTATTCTTATAAGATTCAAGTTGGCTGTC  
 CTTTCTCTGCTCCCCTCAAAGATTTTGTATCATACAGAAATGTTAATATATTAT  
 GTATTCTGACTTTTTTTTTCCCCCGGAGTCTTGATATTTATAGTTTTCTATAT  
 AAAGTGTAGTATCTTCATGAAGAACCAGGCTCAAAATTTACTGTCTCTAAAA  
 ACAATTTCTATAGGATTATTCTTTTCATGGTATTTTCTTCCATAAATATCTCATT  
 TTAAGAAAGAGTTCTTTATGAAACTTAGTGTCCATTGTATGCAATGTTTTTTT  
 TTTCCATTCTTTTTCCCTGTAAATTTTGAATTTCTGGTCTGGGAAGAAATCAA  
 ACAAAATCTTAAGTTCTATGAGAACTTGGTTCATTGACATATTCTGCTGAAGA  
 AAGAAAAATTAATTTGGTAGTAAAAATAGTCTTCAAGTATACGTTTGAGAG  
 TGCTTTTTTTGTATTAGTTCTGCTGTCACTTCATTTCCTGTATATATGTGATG  
 TTTTTCCCCTATAAAATACCAGAGATAATGGAGATATTTTGCACTTTAGCCCT  
 GATGAAAAGTACAAGATATGTTCAAAGCTTCCCTAAATTTTTTCTTATTGTA  
 GCCACATAAGTTTCAAGAAATAACATGGCACACAGAAACAATGGAAAAAGTTT  
 GTTTCATTGGAAAAATTATATCATTTTGGGTTGGCACATCAGTTTATAAATTTG  
 CGGCTCTTTTAAATTACACTCTGTAGAAGGTTAATAGAGCTTGAGCCCTGCTTT  
 AATATGTAGTGAAAGATAATTCTGTAGAAAAACGTGAGCCAGTAGGGTAAAG

FIG. 1A-1

【図1】

TCATTCTACTGTTCTTAATTTTTATATTGAGGAACAATATTGGGTGTTTGGGAG  
 CCAGAAAGCTTGTGACAGATCAGAAATAAGATTGACTTGGGTGTTATATTT  
 CATCTCTCTCCAGACTCTAGGTATATTTCCAACCTTTATATATCACAGTATTTAA  
 AAAGACATGTTTGCATTGAGAAATTAACCCCTAAAGGGTTTTCAATAGGGTGT  
 AGACCTCCAGTACCTTTGTAACATAAGTCTGTCTAGTCATTGTAATATTTAT  
 CTGTCACTTTTGACAGATTGGGGCCAGCTTGATGTTTTAAATCTTCAGCCCGG  
 TATGAAACCTTAAAGGTATATATCAATTTTTTACCATTTTATGGAAAAATATT  
 TAAAAATTTGTTTTTACAGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAACTCTGTGC  
 CATGAAATTTGAAAACCAACCAAAATCAAGGGAACCTTTATATATTTCAATTC  
 CTTTTCTGGTGTAATGTTAAAGTTGTATAGATTATTAATGCATGCCACTGAA  
 TATAACCCCTGGTTTTGTGATAAACTGCTTAGATTTTGTGATGACATTAGAT  
 TAGTAGTTGCATTAAATAACTAAATCCCATTGTGATTAAATGAAATTTTGTCT  
 TTTAAGCAGAGAGTTATTTGTGACTATAAGCTTTGTGCTTAGAGAATGTATGT  
 GTTTTTATCTGTCAATATGGGAGGATATAAACTGCATCATTAGTGAAATTAAT  
 GGTGTGTAAATCCTTTGTGAAATATAATCTAGGTATTTGATAGGGTATTGAG  
 TGTATTTTGTGTGTGTGGATGTGTGTTTTGGGGTACGGGGAGAGGCGGATGC  
 TATTGGCCATCACTACCAACCAGGGTTTCAAAAAGTATATACCTAAGTAATTT  
 CTTTTATCACTACCTCAACTGAGGAAGAAAAGGCTCACCACAAGTGGTGTGA  
 AGGCTTTGGGTACTTAGTTCTAAATTTTTTATGGTAACATATACATAGCCAC  
 ATTTACAGTTTTAACCATTTTAAGGCATGTAATTCAGTGGGGTAGGTACATT  
 CACAATGTTGTGTAATGATCACCGCCGTG

FIG. 1A-2

【図1】

MSQAVQNTGTQPLSKTWELSLYELQRTPQEAITDGLIIVSPRSLGSELMCPICLDM  
 LKNTMTTKECLHRFCADCIITALRSGNKECPTCRKKLVSKRSLRPDPNFDALISKIY  
 PSRDEYEAHQERVLARINKHNNQALSHSIEEGLKIQAMNRLQRGKKQIENGSG  
 AEDNGDSSHCSNASTHNSQEAQPSNKRKTSDDSGLELDNNNAAMADIPVMDGA  
 SEIELVFRHEPTLMEKDDSAQTRYIKTSGNATVDHLSKYLAVRLALEELRSKGEN  
 QMNLDTASEKQYTIYIATASGQFTVLNGSFSLELVSEKYWKVNKPMELYAPTKE  
 HK

FIG. 1B



【図2】

	10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890		
AGTGGAGCAG	AAGATAATGG	TGACAGCTCC	CACTGTAGTA	ACGCATCCAC		50
ACACAGCAAC	CAGGAAGCGG	GCCCCGAGTAA	CAAACGGACC	AAAACCTCTG		100
ATGACTCTGG	GCTTGATCTT	GATAACAACA	ATGCAGGAGT	GGCGATTGAT		150
CCAGTCATGG	ACGGTGCCAG	TGAGATTGAG	TTAGTCTTCA	GGCCCCATCC		200
AACTCTTATG	GAAAAGGACG	ACAGCGCACA	GACGAGATAC	ATAAAGACTT		250
CAGGCAATGC	CACTGTTGAT	CACTTATCCA	AGTATCTGGC	TGTGAGGTTA		300
GCTTTAGAAG	AACTTCGAAG	CAAAGTGA				328

FIG. 2A

【図2】

SGAEDNGDSSHCNSASTHSNQEAGPSNKRKTSDDSGLDLNNNAGVAIDPVM  
 GASEIELVFRPHTLMEKDDSAQTRYIKTSGNATVDHL SKYLAVRLALEELRSKV

FIG. 2B

【図3】

Flag



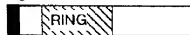
1-336aa

Flag



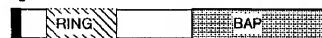
109-336aa

Flag



1-167aa

Flag



1-275aa

FIG. 3

【図4】

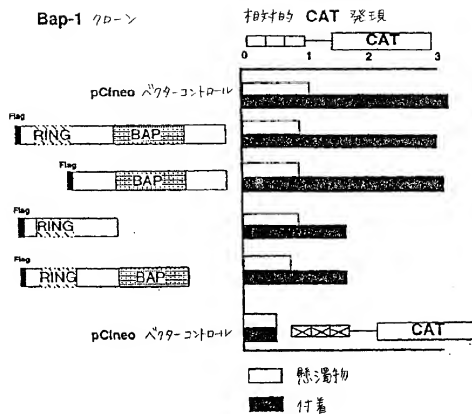


FIG. 4

【図5】

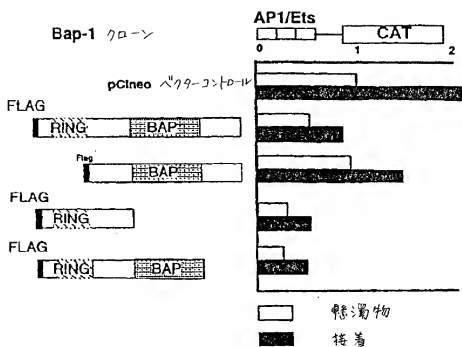


FIG. 5

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No.

PCT/US 97/20951

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

All minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of database and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 15145 A (UNIV PENNSYLVANIA ; SCRIPPS RESEARCH INST (US)) 23 May 1996 see the whole document, especially example 1 ---	1-29
A	HYNES R O: "INTEGRINS: VERSATILITY, MODULATION, AND SIGNALING IN CELL ADHESION" CELL. vol. 69, no. 1, 3 April 1992. pages 11-25, XP000263014 cited in the application see the whole document, especially page 20 --- -/-	1-29

☒ Further documents are listed in the continuations of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not restricted to a particular invention

"C" earlier document but published after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the progress or history underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other cited documents, each combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 1998

Date of making of the international search report

21.04.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5616 Patentean 2  
PL 2000 Nijmegen  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 601 apo nl,  
Fax: (+31-70) 344-5216

Authorized officer

Mandl, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information: Application No.

PCT/US 97/20951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHATTIL S.J. ET AL.: "beta-3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta-3 subunit." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 131, no. 3, 1995, pages 887--816, XP002060569 cited in the application see the whole document, especially Introduction and page 808: 'Library Screening'	1-12
A	LOVERING R. ET AL.: "Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 90, 1993, pages 2112-2116, XP002060570 see the whole document	1-12
A	MARGUERIE G. ET AL.: "PLATELET ALPHA-11B-BETA-3: A PHARMACOLOGICAL INTEGRIN AS A TARGET TO DESIGN NEW MOLECULES WITH ANTITHROMBOTIC ACTIVITY" JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL HEMATOLOGY / NOUVELLE REVUE FRANCAISE HEMATOLOGIE, vol. 35, no. 3, 1993, page 253/254 XP000672886 see the whole document	13-29
P.O. X	DYER M J S ET AL: "Identification of novel ring finger genes that interact with BCL7A." ABSTRACTS OF PAPERS PRESENTED AT THE ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE BRITISH SOCIETY FOR HAEMATOLOGY 14 - 17 April 1997, HARROGATE, ENGLAND, UK, page 10 XP002060571 see abstract A32 & EMBL Database entry HSDING; num ber Y10571; 17.01.1997; et al .: 'Interactions of BCL7A with novel ring fi nger proteins.' see abstract	1-12

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Publication No.

PCT/US 97/20951

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
P,X	<p>SCHODORLEMMER J. ET AL.: "Ring1A is a transcriptional repressor that interacts with the Polycomb-M33 protein and is expressed at rhombomere boundaries in the mouse hindbrain."</p> <p>THE EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 19, 1 October 1997, pages 5930-5942, XP002060572 see the whole document</p> <p>-----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on parent family members

International Publication No.

PCT/US 97/20951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9615145 A	23-05-96	US 5585463 A	17-12-96
		CA 2204665 A	23-05-96
		EP 0797588 A	01-10-97
		US 5661005 A	26-08-97
-----			



## フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 0 7 K	14/47	C 0 7 K	16/18
	16/18		17/00
	17/00	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/15		1/19
	1/19		1/21
	1/21	C 1 2 P	21/08
	5/10	C 1 2 Q	1/48
C 1 2 P	21/08	G 0 1 N	33/15
C 1 2 Q	1/48		33/50
G 0 1 N	33/15	C 1 2 N	15/00
	33/50		5/00
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L, U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW		Z Z Z Z N A A A